

Aus der Klinik für Innere Medizin

Schwerpunkt Hämatologie, Onkologie und Immunologie

**Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. Andreas Neubauer**

des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

**10-Jahres-Überlebensrate von Patienten  
mit kolorektalem Karzinom in  
Abhängigkeit vom PIK3CA- und KRAS-  
Mutations- und  
Acetylsalicylsäureeinnahmestatus**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin

dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

**Leonie Gebauer**

aus Celle

Marburg, 2020

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am:  
12.10.2020

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin.

Prodekan: Herr Prof. Dr. Rolf Müller

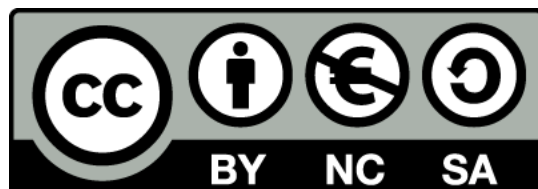
Referent: Herr Prof. Dr. Andreas Neubauer

Korreferent: Herr Prof. Dr. Malte Buchholz

Originaldokument gespeichert auf dem Publikationsserver der

Philipps-Universität Marburg

<https://archiv.ub.uni-marburg.de>



Dieses Werk bzw. Inhalt steht unter einer

Creative Commons

Namensnennung

Keine kommerzielle Nutzung

Weitergabe unter gleichen Bedingungen

4.0 International Lizenz.

Die vollständige Lizenz finden Sie unter:

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>





# Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis .....	IV
Tabellenverzeichnis.....	VI
Abkürzungsverzeichnis.....	VII
1. Einleitung .....	1
1.1 Das kolorektale Karzinom.....	1
1.1.1 Epidemiologie .....	1
1.1.2 Ätiologie und Risikofaktoren .....	2
1.1.3 Stadieneinteilung .....	2
1.1.4 Therapie .....	4
1.2 Pathogenese des kolorektalen Karzinoms .....	6
1.2.1 Das Protoonkogen KRAS .....	7
1.2.2 Die Phosphatidylinositol-3-Kinasen.....	8
1.3 Cyclooxygenasen und ihre Inhibitoren.....	12
1.3.1 Aufbau und Funktion .....	12
1.3.2 COX-Inhibitoren .....	13
1.4 Ausblick.....	17
2. Zielsetzung.....	18
3. Patienten, Materialien und Methoden .....	19
3.1 Laborgeräte .....	19
3.2 Chemikalien und Enzyme .....	20
3.3 Kits.....	20
3.4 Labormaterialien .....	21
3.5 Verwendete Primer .....	21
3.6 Zelllinien .....	23
3.7 Patienten.....	23

3.7.1 Patientenrekrutierung.....	23
3.7.2 Klinische Informationen.....	24
3.8 Methoden .....	27
3.8.1 DNA-Isolation.....	27
3.8.2 Polymerase-Ketten-Reaktion .....	30
3.8.3 Pyrosequenzierung .....	31
3.8.4 KRAS Multiplex-Sequenzierung.....	37
3.9 Statistische Auswertung.....	37
4. Ergebnisse .....	39
4.1 Charakteristika des gesamten Patientenkollektivs .....	39
4.1.1 Alters- und Geschlechterverteilung .....	39
4.1.2 Tumorlokalisation.....	39
4.1.3 Tumordifferenzierung und UICC-Stadium .....	40
4.1.4 Mutationsstatus im KRAS- und PIK3CA-Gen.....	40
4.1.5 ASS-Einnahmestatus.....	43
4.1.6 Absolute 10-Jahres-Überlebensrate .....	43
4.2 Charakteristika des Patientenkollektivs in Bezug auf den PIK3CA-Mutationsstatus.....	44
4.2.1 Vergleich der Patientenkollektive mit Primärtumoren mit PIK3CA-WT und PIK3CA-Mut. ....	46
4.2.2 Vergleich der Patientenkollektive mit und ohne regelmäßige ASS-Einnahme nach Diagnosestellung des KRK .....	47
4.3 Charakteristika des Patientenkollektivs in Bezug auf den KRAS-Mutationsstatus .....	48
4.3.1 Vergleich der Patientenkollektive mit Primärtumoren mit KRAS-WT und KRAS-Mut. ....	50
4.4 Mutationsstatus und Prognose.....	51
4.4.1 Korrelation von Mutationsstatus des PIK3CA-Gens und OS .....	51

4.4.2 Korrelation von Mutationsstatus des KRAS-Gens und OS .....	52
4.5 ASS-Einnahmestatus und Prognose.....	53
4.6 Korrelation von ASS-Einnahmestatus und OS in Abhängigkeit des Mutationsstatus der Gene KRAS und PIK3CA .....	54
4.6.1 Isolierte Betrachtung des PIK3CA-Mutationsstatus .....	54
4.6.2 Isolierte Betrachtung des KRAS-Mutationsstatus .....	57
4.6.3 Kombinierte Betrachtung des KRAS- und PIK3CA-Mutationsstatus .....	58
4.6.4 Patienten mit PIK3CA-WT/KRAS-Mut.....	63
5. Diskussion .....	64
5.1 Diskussion der Methoden.....	64
5.1.1 Studiendesign.....	64
5.1.2 Probenrekrutierung, Mutationsanalysen .....	65
5.2 Diskussion der Ergebnisse .....	66
5.2.1 Patientenkollektiv .....	66
5.2.2 Mutationsanalysen und Prognose .....	68
5.2.3 ASS-Einnahmestatus in Bezug auf das OS.....	70
5.3 Ausblick.....	78
Zusammenfassung .....	80
Literaturverzeichnis .....	84
Anhang.....	101

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Prozentualer Anteil der weltweit häufigsten Tumorlokalisationen .....	1
Abb. 2: Schematische Darstellung der Adenom-Karzinom-Sequenz .....	6
Abb. 3: Domänenstruktur der PI3K Klasse IA .....	8
Abb. 4: Schematische Darstellung des Mechanismus der Aktivierung der PI3K der Klasse IA .....	9
Abb. 5: Schematische Darstellung der Signalwege ausgehend von PKB/AKT .....	11
Abb. 6: Schematische Darstellung der Prostaglandinsynthese .....	13
Abb. 7: Flussdiagramm Patientenkollektiv dieser Arbeit .....	24
Abb. 8: Schematische Darstellung der Pyrosequenzierung .....	33
Abb. 9: Pyrogramm: Wildtyp im Exon 20 des PIK3CA-Gen .....	36
Abb. 10: Pyrogramm: c.3140A>G Mutation im Exon 20 des PIK3CA-Gen .....	36
Abb. 11: Altersverteilung des gesamten Patientenkollektivs zum Diagnosezeitpunkt des KRK .....	39
Abb. 12: PIK3CA-Mutationsstatus des Gesamtkollektivs .....	41
Abb. 13: KRAS-Mutationsstatus des Gesamtkollektivs .....	42
Abb. 14: ASS-Einnahmestatus des Gesamtkollektivs .....	43
Abb. 15: Kaplan-Meier-Kurve, Gesamtkollektiv, absolute Überlebensrate nach Diagnosestellung des KRK .....	44
Abb. 16: Altersverteilung der Gruppen PIK3CA-Mut. und PIK3CA-WT .....	46
Abb. 17: Altersverteilung der Patienten mit und ohne regelmäßige ASS-Einnahme ....	48
Abb. 18: Altersverteilung der Patienten mit KRAS-Mut. und KRAS-WT .....	50
Abb. 19: Kaplan-Meier-Kurve, Gesamtkollektiv, absolute Überlebensrate nach Diagnosestellung des KRK in Abhängigkeit vom PIK3CA-Mutationsstatus .....	51
Abb. 20: Kaplan-Meier-Kurve, Gesamtkollektiv, absolute Überlebensrate nach Diagnosestellung des KRK in Abhängigkeit vom KRAS-Mutationsstatus .....	52
Abb. 21: Kaplan-Meier-Kurve, Gesamtkollektiv, absolute Überlebensrate nach Diagnosestellung des KRK in Abhängigkeit vom ASS-Einnahmestatus .....	53
Abb. 22: Kaplan-Meier-Kurve, Patienten mit regelmäßiger ASS-Einnahme, absolute Überlebensrate nach Diagnosestellung des KRK in Abhängigkeit vom PIK3CA-Mutationsstatus .....	55

Abb. 23: Kaplan-Meier-Kurve, Patienten ohne regelmäßige ASS-Einnahme, absolute Überlebensrate nach Diagnosestellung des KRK in Abhängigkeit vom PIK3CA-Mutationsstatus.....	56
Abb. 24: Kaplan-Meier-Kurve, Patienten mit regelmäßiger ASS-Einnahme, absolute Überlebensrate nach Diagnosestellung des KRK in Abhängigkeit vom KRAS-Mutationsstatus.....	57
Abb. 25: Kaplan-Meier-Kurve, Patienten ohne regelmäßige ASS-Einnahme, absolute Überlebensrate nach Diagnosestellung des KRK in Abhängigkeit vom KRAS-Mutationsstatus.....	58
Abb. 26: Kaplan-Meier-Kurve, Patienten mit regelmäßiger ASS-Einnahme, absolute Überlebensrate nach Diagnosestellung des KRK in Abhängigkeit vom KRAS- und PIK3CA-Mutationsstatus, alle Kombinationen des Mutationsstatus.....	59
Abb. 27: Kaplan-Meier-Kurve, Patienten mit regelmäßiger ASS-Einnahme, absolute Überlebensrate nach Diagnosestellung des KRK in Abhängigkeit vom KRAS- und PIK3CA-Mutationsstatus, PIK3CA-WT/KRAS-Mut. und Mutationsstatus ausgenommen PIK3CA-WT/KRAS-Mut. ....	60
Abb. 28: Kaplan-Meier-Kurve, Patienten ohne regelmäßige ASS-Einnahme, absolute Überlebensrate nach Diagnosestellung des KRK in Abhängigkeit vom KRAS- und PIK3CA-Mutationsstatus, alle Kombinationen des Mutationsstatus.....	61
Abb. 29: Kaplan-Meier-Kurve, Patienten ohne regelmäßige ASS-Einnahme, absolute Überlebensrate nach Diagnosestellung des KRK in Abhängigkeit vom KRAS- und PIK3CA-Mutationsstatus, PIK3CA-WT/KRAS-Mut. und Mutationsstatus ausgenommen PIK3CA-WT/KRAS-Mut. ....	62
Abb. 30: Kaplan-Meier-Kurve, Patienten mit PIK3CA-WT und KRAS-Mut., absolute Überlebensrate nach Diagnosestellung des KRK in Abhängigkeit vom ASS-Einnahmestatus.....	63
Abb. 31: Schematische Darstellung der Ubiquitin-abhängige Degradierung von $\beta$ -Catenin in nicht stimulierten Zellen .....	75
Abb. 32: PGE2 abhängige Genexpression und Zellwachstum in Folge einer Überexpression von COX-2.....	76

# Tabellenverzeichnis

Tab. 1: TNM-Klassifikation des KRK.....	3
Tab. 2: Vereinfacht dargestellte Klassifikation der Tumorstadien des KRK (UICC) .....	4
Tab. 3: Verwendete Laborgeräte .....	19
Tab. 4: Verwendete Chemikalien und Enzyme .....	20
Tab. 5: Verwendete Kits .....	20
Tab. 6: Verwendete Labormaterialien .....	21
Tab. 7: Sequenzen und Hersteller der verwendeten PCR-Primer.....	22
Tab. 8: Sequenzen und Hersteller der verwendeten Sequenzierprimer .....	22
Tab. 9: Abstammung, Herkunft und Medium der verwendeten Zelllinien mit Mutation im PIK3CA-Gen.....	23
Tab. 10: Kriterien zur Ermittlung des 10-Jahres-Überlebens.....	25
Tab. 11: Kriterien zur Ermittlung des ASS-Einnahmestatus.....	26
Tab. 12: Bestandteile des QIAamp DNA Mini Kit von Qiagen .....	28
Tab. 13: Pipettierschema für den PCR-Mastermix .....	31
Tab. 14: PCR-Programm.....	31
Tab. 15: Pipettierschema für den Streptavidin-Mix .....	34
Tab. 16: Pipettierschema des Sequenzier-Mix.....	34
Tab. 17: Waschschrte Waschstation Qiagen.....	35
Tab. 18: Prozentuale Verteilung der Tumorlokalisationen des gesamten Patientenkollektivs .....	40
Tab. 19: Verteilung der UICC-Stadien des gesamten Patientenkollektivs.....	40
Tab. 20: Prozentualer Anteil der verschiedenen PIK3CA-Mutationen .....	41
Tab. 21: Prozentualer Anteil der verschiedenen KRAS-Mutationen .....	42
Tab. 22: Demografische, klinische und pathologische Charakteristika der 153 Patienten mit KRK in Bezug auf den PIK3CA-Mutationsstatus und den ASS-Einnahmestatus....	45
Tab. 23: Demografische, klinische und pathologische Charakteristika der 153 Patienten mit KRK in Bezug auf den KRAS-Mutationsstatus und den ASS-Einnahmestatus.....	49

## Abkürzungsverzeichnis

<b>Abkürzung</b>	<b>Bedeutung</b>
<b>µl</b>	Mikroliter
<b>Abb.</b>	Abbildung
<b>AK</b>	Antikörper
<b>AKT</b>	Proteinkinase B
<b>AL-Puffer</b>	Lysis-Puffer
<b>APC</b>	Adenomatous-polyposis-coli-Protein
<b>APS</b>	Adensoin-5'-phosphosulfat
<b>ASS</b>	Acetylsalicylsäure
<b>ATL-Puffer</b>	Tissue-Lysis-Puffer
<b>AWMF</b>	Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften
<b>BRAF</b>	v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B
<b>CA</b>	Carcinoma
<b>CI/KI</b>	Konfidenzintervall
<b>COX</b>	Cyclooxygenase
<b>DCC</b>	Deleted in Colorectal Carcinoma
<b>DNA</b>	Desoxyribonukleinsäure
<b>dNTP</b>	Desoxyribonukleotid-Triphosphat
<b>EGF</b>	Epidermal growth factor
<b>EGFR</b>	Epidermal growth factor receptor
<b>ERK</b>	Extracellular signal-regulated kinase
<b>FAP</b>	Familiäre adenomatöse Polyposis
<b>g</b>	Erdbeschleunigung
<b>GDP</b>	Guanosindiphosphat
<b>G-Protein</b>	Guaninnucleotid-bindendes-Protein
<b>GTP</b>	Guanosintriphosphat
<b>HLA</b>	Humanes Leukozytenantigen
<b>HNPCC</b>	Hereditäres nicht-polypöses Kolonkarzinom
<b>HR</b>	Hazard Ratio

<b>HRAS</b>	Harvey-RAS
<b>IRS-1</b>	Insulin-Rezeptor-Substrat-1
<b>kDA</b>	Kilodalton
<b>KRAS</b>	Kirsten rat sarcoma
<b>KRK</b>	Kolorektales Karzinom
<b>MAPK</b>	Mitogen activated phosphorylated kinase
<b>MEK</b>	Mitogen activated protein kinase
<b>mg</b>	Milligramm
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	Magnesiumchlorid
<b>ml</b>	Milliliter
<b>Mut.</b>	Mutation
<b>N</b>	Regionaler Lymphknotenstatus
<b>n</b>	Anzahl
<b>nM</b>	Nanomol
<b>NRAS</b>	Neuroblastom-RAS
<b>NSAR</b>	Nichtsteroidale Antirheumatika
<b>OS</b>	Overall Survival
<b>p</b>	P-Wert/Signifikanzwert
<b>PAS</b>	Periodik Acid Schiff
<b>PC</b>	Personal Computer
<b>PCR</b>	Polymerase-Chain-Reaktion
<b>PDK1</b>	3-Phosphoinositid-abhängige Proteinkinase-1
<b>PFS</b>	Progression-free survival
<b>PG</b>	Prostaglandin
<b>PGE<sub>2</sub></b>	Prostaglandin E <sub>2</sub>
<b>PGG<sub>2</sub></b>	Prostaglandin G <sub>2</sub>
<b>PGH<sub>2</sub></b>	Prostaglandin H <sub>2</sub>
<b>PH-Region</b>	Pleckstrin Homology-Region
<b>PI3K</b>	Phosphatidylinositol-3-Kinase
<b>PID</b>	Patienten-Identifikation
<b>PIK3CA</b>	Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase Catalytic Subunit Alpha
<b>PIP<sub>2</sub></b>	Phosphatidylinositol(3,4)bisphosphat



<b>PIP<sub>3</sub></b>	Phosphatidylinositol(3,4,5)trisphosphat
<b>PP2A</b>	Proteinphosphatase 2A
<b>PPi</b>	Pyrophosphat
<b>PTEN</b>	Phosphatase and Tensin homolog
<b>Raf</b>	Rapidly accelerated fibrosarcoma
<b>RAS</b>	Rat-Sarkoma
<b>RFS</b>	Recurrence-free survival
<b>RKI</b>	Robert-Koch-Institut
<b>rpm</b>	Revolutions per minute
<b>SD</b>	Standartabweichung
<b>T</b>	Infiltrationstiefe des Primärtumors
<b>Tab.</b>	Tabelle
<b>TIA</b>	Transitorisch Ischämische Attacke
<b>UICC</b>	Union Internationale Contre le Cancer
<b>USB</b>	Universal Serial Bus
<b>VEGFR</b>	Vascular endothelial growth factor receptor
<b>vs.</b>	Versus
<b>WT</b>	Wildtyp

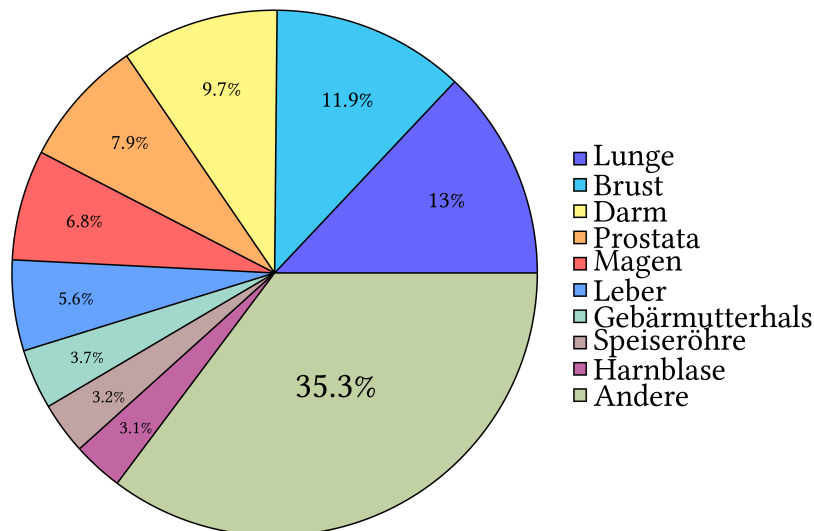
# 1. Einleitung

## 1.1 Das kolorektale Karzinom

Unter dem Begriff kolorektales Karzinom (kurz: KRK) werden Karzinome von Kolon und Rektum zusammengefasst. Im Verlauf wird näher auf die Epidemiologie, Ätiologie, Einteilung und Therapie des KRK eingegangen.

### 1.1.1 Epidemiologie

Das KRK gehört mit 1,4 Millionen Neuerkrankungen pro Jahr zu den häufigsten Krebserkrankungen weltweit. In der Rangfolge dieser befindet es sich bei Männern an Position drei (Position eins und zwei: Lungen- und Prostatakrebs) und bei Frauen an Position zwei (Position eins: Brustkrebs) (Brody 2015; Stewart und Wild 2014). Abbildung (kurz: Abb.) 1 ist zu entnehmen, dass das KRK bei Betrachtung beider Geschlechter gemeinsam die dritte Position der weltweit häufigsten Tumorlokalisationen einnimmt (Position eins und zwei: Lungen- und Brustkrebs).



**Abb. 1: Prozentualer Anteil der weltweit häufigsten Tumorlokalisationen (ausgenommen Hautkrebs, Stand 2012).** Quelle: Eigene Darstellung, basierend auf (Stewart und Wild 2014).

Mit weltweit fast 700.000 Todesfällen pro Jahr gehört das KRK zudem zu den häufigsten krebsbedingten Todesursachen (Stewart und Wild 2014).

Bezogen auf Deutschland erkrankten im Jahr 2014 laut Daten des Robert-Koch-Instituts (kurz: RKI) 27.890 Frauen und 34.120 Männer an einem KRK. Die altersstandartisierte

Erkrankungsrate lag bei 54,0 je 100.000 Einwohner bei den Männern und bei 35,7 je 100.000 Einwohner bei den Frauen. Das durchschnittliche Erkrankungsalter lag bei den Männern bei 70,3 Jahren und bei den Frauen bei 72,9 Jahren mit absoluten 10-Jahres-Überlebensraten von 38% (Männer) und 40% (Frauen). Die absolute Zahl der Neuerkrankungen in Deutschland ist seit 2014 rückläufig (Zentrum für Krebsregisterdaten im Robert Koch-Institut (Hrsg.) 2016).

Im Rahmen des gesetzlichen Krebsfrüherkennungsprogramms ist ab dem 50. Lebensjahr einmal jährlich ein Test auf okkultes Blut im Stuhl vorgesehen. Ab dem 55. Lebensjahr sollte eine Früherkennungskoloskopie mit einmaliger Wiederholung nach mindestens 10 Jahren bei unauffälligem Befund erfolgen (Zentrum für Krebsregisterdaten im Robert Koch-Institut (Hrsg.) 2016).

### **1.1.2 Ätiologie und Risikofaktoren**

Bei 3-6% der Patienten liegt das KRK im Rahmen definierter genetischer Syndrome vor, wohingegen 95% aller KRK sporadisch mit multifaktorieller Genese auftreten (Kanth et al. 2017). Zu den genetischen Syndromen gehören das Lynch-Syndrom, die familiäre adenomatöse Polyposis (kurz: FAP) sowie weitere familiäre Polyposis-Syndrome (Burt et al. 1995).

Relevante Risikofaktoren für das sporadische KRK stellen das Alter, mit deutlichem Anstieg der Erkrankungswahrscheinlichkeit nach dem 50. Lebensjahr, sowie das männliche Geschlecht dar (Kim et al. 2015; Rasool et al. 2013). Als weitere Risikofaktoren sind das Vorliegen chronisch entzündlicher Darmerkrankungen, eine positive Familien- oder Eigenanamnese für Darmkrebs, Adipositas und geringe körperliche Aktivität sowie Rauchen und übermäßiger Konsum von Alkohol und rotem Fleisch zu nennen (Fedirko et al. 2011; Jess et al. 2012; Kanth et al. 2017; Liang et al. 2009; Ma et al. 2013; Taylor et al. 2010).

### **1.1.3 Stadieneinteilung**

KRK werden mit Hilfe der von P. Denoix entwickelten TNM-Klassifikation der Union Internationale Contre le Cancer (kurz: UICC) eingeteilt. Dabei werden sowohl die Infiltrationstiefe des Primärtumors (T), als auch der regionale Lymphknotenstatus (N) und eventuell vorhandene Fernmetastasen (M) berücksichtigt (Wittekind 2017). Die aktuelle TNM-Klassifikation ist Tabelle (kurz: Tab.) 1 zu entnehmen.

**Tab. 1: TNM-Klassifikation des KRK, 8. Auflage der UICC von 2017.** Quelle: Eigene Darstellung, basierend auf (Wittekind 2017).

<b>T=Infiltrationstiefe des Primärtumors</b>	
<b>Tis</b>	Carcinoma in situ
<b>T1</b>	Tumor infiltriert Submucosa
<b>T2</b>	Tumor infiltriert Muscularis propria
<b>T3</b>	Tumor infiltriert Subserosa
<b>T4</b>	Tumor infiltriert in andere Organe, Strukturen oder das viszerale Peritoneum
<b>-T4a</b>	Tumor perforiert das viszerale Peritoneum
<b>-T4b</b>	Tumor infiltriert direkt in andere Organe oder Strukturen
<b>N=regionaler Lymphknotenstatus</b>	
<b>N0</b>	Keine regionären Metastasen in Lymphknoten
<b>N1</b>	Metastasen in 1-3 regionären Lymphknoten
<b>-N1a</b>	Metastasen in einem regionären Lymphknoten
<b>-N1b</b>	Metastasen in 2-3 regionären Lymphknoten
<b>-N1c</b>	Satelliten im Fettgewebe der Subserosa oder im perikolischen Fettgewebe ohne regionäre Lymphknoten
<b>N2</b>	Metastasen in 4 oder mehr regionären Lymphknoten
<b>-N2a</b>	Metastasen in 4-6 regionären Lymphknoten
<b>-N2b</b>	Metastasen in 7 oder mehr regionären Lymphknoten
<b>M=Fernmetastasen</b>	
<b>M0</b>	Keine Fernmetastasen
<b>M1</b>	Fernmetastasen vorhanden
<b>-M1a</b>	Fernmetastasen in einem Organ
<b>-M1b</b>	Fernmetastasen in mehr als einem Organ
<b>-M1c</b>	Metastasen im Peritoneum

Mit Hilfe dieser Informationen erfolgt eine Stadiengruppierung in die UICC-Stadien 0, I, II, III und IV. Das Krankheitsstadium ist sowohl für die Therapieentscheidung als auch für die Einschätzung der Prognose eines Patienten relevant. Die aktuelle, vereinfachte Klassifikation der Tumorstadien des KRK ist Tab. 2 zu entnehmen.

**Tab. 2: Vereinfacht dargestellte Klassifikation der Tumorstadien des KRK (UICC).**  
T=Infiltrationstiefe des Primärtumors, N=regionaler Lymphknotenstatus, M=Fernmetastasen. Quelle:  
Eigene Darstellung, basierend auf (Wittekind 2017).

	<b>T</b>	<b>N</b>	<b>M</b>
<b>Stadium 0</b>	Tis	N0	M0
<b>Stadium I</b>	T1/T2	N0	M0
<b>Stadium II</b>	T3/T4	N0	M0
<b>Stadium III</b>	Jedes T	N1/N2	M0
<b>Stadium IV</b>	Jedes T	Jedes N	M1

### 1.1.4 Therapie

Die hier vereinfacht dargestellten Therapieempfehlungen sind den aktuellen S3-Leitlinien (erschienen: Januar 2019) des Leitlinienprogramm Onkologie der Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (kurz: AWMF) entnommen (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe 2019).

Die Therapie des KRK besteht aus mehreren Elementen an einem dafür ausgewiesenen Zentrum. Den Goldstandard stellt die leitliniengerechte chirurgische Entfernung des Tumors dar. Dabei sollten mindestens 12 Lymphknoten entfernt und untersucht werden. Je nach Tumorlokalisation und UICC-Stadium erfolgt neoadjuvant oder adjuvant eine entsprechende weitere Therapie.

Bei Patienten mit einem kurativ resezierten Kolonkarzinom und UICC Stadium I ist keine adjuvante Therapie indiziert. Patienten im UICC-Stadium II und III sollten nach Möglichkeit in Studien eingeschlossen werden. Außerhalb von Studien kann im UICC Stadium II bei Risikokonstellation eine adjuvante Therapie durchgeführt werden. Im UICC-Stadium III ist nach erfolgter Operation eine adjuvante oxaliplatinhaltige Chemotherapie indiziert. In mehreren Studien und Meta-Analysen zeigte sich für diese Patienten nach Durchführung einer adjuvanten Therapie ein signifikanter Überlebensvorteil gegenüber einer alleinigen Operation (Dube et al. 1997; Francini et al. 1994; O'Connell et al. 1997; Sargent et al. 2001).

Bei Patienten mit Rektumkarzinomen im UICC-Stadium I ist nach R0-Resektion keine adjuvante Therapie indiziert. Zudem sollte keine neoadjuvante Therapie erfolgen. Im

UICC-Stadium II und III wird allerdings bei einem Tumor im unteren und mittleren Rektumdrittel eine neoadjuvante Radiochemotherapie durchgeführt. Tumore im oberen Rektumdrittel werden analog der Kolonkarzinome behandelt.

Bei Patienten im UICC-Stadium IV sollten, wenn eine R0-Resektion möglich ist, resektable Leber- und Lungenmetastasen reseziert werden. Im UICC-Stadium IV sollte die Therapieentscheidung bezüglich der medikamentösen Therapie unter Berücksichtigung von Allgemeinzustand, Krankheitsausdehnung und Molekularbiologie des Tumors an einem ausgewiesenen Zentrum erfolgen (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe 2019).

#### **1.1.4.1 Monoklonale Antikörpertherapie**

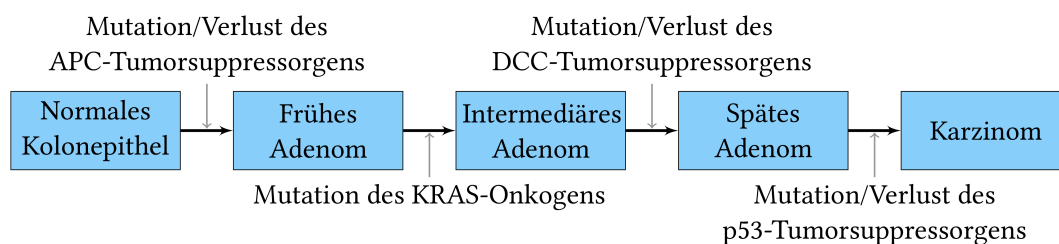
In der Therapie des metastasierten KRK hat die monoklonale Antikörpertherapie mit der Einführung von Antikörpern (kurz: AK) gegen den epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor (englisch: epidermal growth factor receptor, kurz: EGFR; Wirkstoffe: Cetuximab, Panitumumab) und den vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor-Rezeptor (englisch: vascular endothelial growth factor receptor, kurz: VEGFR; Wirkstoff: Bevacizumab) in den letzten Jahren eine wichtige Rolle eingenommen (Benvenuti et al. 2007; Strickler und Hurwitz 2012). Der EGFR ist ein Tyrosinkinaserzeptor, der komplexe Signaltransduktionswege einleitet und damit die Zellproliferation, Apoptose, Invasion und die Differenzierung der Zelle steuert (Yarden 2001). Nach Bindung eines Liganden an den EGFR erfolgt eine Autophosphorylierung. Anschließend kann beispielsweise der RAS-RAF-MEK-ERK Signalweg aktiviert werden (Goffin und Zbuk 2013). Durch Dysregulationen im Bereich des EGFR in Tumorzellen können beispielsweise Proliferation und Invasion ins umliegende Gewebe begünstigt werden (Yarden 2001). An dieser Stelle greifen Antikörper gegen EGFR ein und verhindern durch ihre Bindung, dass Liganden binden. Dadurch wird die Aktivierung von Signaltransduktionswegen gehemmt (Humblet 2004). Allerdings konnte in mehreren großen Studien gezeigt werden, dass der Mutationsstatus des KRAS-Gens eine wichtige Rolle für das Ansprechen einer EGFR-Antikörper-Therapie spielt. Nur Patienten mit KRAS-Wildtyp (kurz: WT) in Exon 12 und Exon 13 zeigten bei Hinzunahme eines EGFR-Antikörpers zur leitliniengerechten Chemotherapie ein verbessertes progressionsfreies Überleben (englisch: progression-free survival, kurz: PFS) beziehungsweise OS (Benvenuti et al. 2007; Bokemeyer et al. 2009; Lièvre et al.

2006; Sartore-Bianchi et al. 2007; van Cutsem et al. 2009). Weitere mögliche Biomarker für die Wirksamkeit einer EGFR-Antikörpertherapie wie BRAF- oder PIK3CA-Mutationsstatus sind Bestandteil der Forschung (Sartore-Bianchi et al. 2009; Perrone et al. 2009; Sood et al. 2012; Prenen et al. 2009; Roock et al. 2010).

Der humanisierte monoklonale AK Bevacizumab bindet an das lösliche VEGF-Molekül und verhindert dadurch eine überschießende Angiogenese. Die bei den EGFR-Antikörpern diskutierten molekularen Biomarker scheinen aufgrund der aktuellen Datenlage einen deutlich geringeren Einfluss zu haben (Hurwitz et al. 2009; Ince et al. 2005).

## 1.2 Pathogenese des kolorektalen Karzinoms

Die Entstehung des KRK beruht auf schrittweise auftretenden genetischen und epigenetischen Veränderungen, die dazu führen, dass aus normalem Darmepithel in einer mehrschrittigen Pathogenese adenomatöse Polypen und schließlich invasive Karzinome entstehen. Fearon und Vogelstein erstellten im Jahr 1990 ein genetisches Modell für die Entstehung des KRK und bezeichneten dies als Adenom-Karzinom-Sequenz (sogenanntes „Vogelgramm“). Sie beschrieben, dass in vielen Fällen Mutationen, die zur Inaktivierung von Tumorsuppressoren und Aktivierung von Onkogenen führen, in einer bestimmten Reihenfolge erfolgen. Diese ist Abb. 2 zu entnehmen (Fearon und Vogelstein 1990).



**Abb. 2: Schematische Darstellung der Adenom-Karzinom-Sequenz.** Quelle: Eigene Darstellung, basierend auf (Fearon und Vogelstein 1990).

Hierbei erfolgt die erste Mutation im für den Tumorsuppressor Adenomatous-polyposis-coli-Protein (kurz: APC) codierenden Gen, gefolgt von Mutationen in den Genen KRAS (Kirsten Rat Sarcoma), TP53 (für das Protein p53 kodierendes Gen) und DCC (Deleted in Colorectal Carcinoma) (Fearon und Vogelstein 1990). Später wurde klar, dass neben diesen Genen noch weitere Gene, wie BRAF (v-Raf murine sarcoma

viral oncogene homolog B) und PIK3CA (Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase Catalytic Subunit Alpha), eine kausale Rolle bei der Tumorentstehung spielen (Calistri et al. 2005; Engelman et al. 2006; McCubrey et al. 2006; Samuels et al. 2005). Im Verlauf wird schwerpunktmäßig auf die für diese Arbeit relevanten Gene und Signalwege eingegangen.

### 1.2.1 Das Protoonkogen KRAS

Als Protoonkogene werden Gene bezeichnet, die beispielsweise an Zellwachstum, Proliferation oder Hemmung von Apoptosen beteiligt sind und durch Mutationen zu Onkogenen mutieren und damit zu unreguliertem Wachstum führen können (Bishop 1991). Die RAS (Rat sarcoma)-Genfamilie gehört, unter den für die Krebsentstehung relevanten Genen, zu den am besten erforschten Genfamilien. RAS-Mutationen finden sich bei einer Vielzahl von Tumoren, unter anderem beim Pankreaskarzinom, Schilddrüsenkarzinom, Lungenkarzinom, Rhabdomyosarkom und beim KRK (Almoguera et al. 1988; Kranenburg 2005; Stratton et al. 1989). Es gibt die RAS-Isoformen NRAS (Neuroblastom-RAS), HRAS (Harvey-RAS) und KRAS (Kirsten-RAS), wobei KRAS mit 86% aller RAS-Mutationen am häufigsten mutiert ist (Bamford et al. 2004; Forbes et al. 2017). Das KRAS-Gen kodiert für das KRAS-Protein, auf welches im Folgenden detailliert eingegangen wird.

#### 1.2.1.1 Struktur und Funktion des KRAS-Proteins

Das KRAS-Protein ist ein 189 Aminosäuren enthaltendes, Membran- und Guaninnucleotid-bindendes-(kurz: G-)Protein mit GTPase-Aktivität. Es nimmt eine Schlüsselfunktion in Signaltransduktionswegen, die der Zelldifferenzierung und Zellproliferation dienen, ein (Bourne et al. 1990, 1991). In ruhenden Zellen befindet sich das KRAS-Protein in einem inaktiven Guanosindiphosphat-(kurz: GDP)bindenden Zustand. Wird es im Rahmen der Signaltransduktion aktiviert, wechselt es in einen aktiven Guanosintriphosphat-(kurz: GTP)bindenden-Zustand (Boguski und McCormick 1993). Downstream aktiviert das KRAS-Protein in seiner GTP gebundenen Form verschiedene Signalwege, wie beispielsweise den MAPK-Signalweg (Boguski und McCormick 1993; Mitin et al. 2005; Schubbert et al. 2007; Shields et al. 2000). Das KRAS-Protein besitzt eine intrinsische GTPase-Aktivität mit Hilfe derer eine hydrolytische Spaltung des gebundenen GTP zu GDP erfolgt und das KRAS-Protein inaktiviert wird (Bourne et al. 1990, 1991).



### 1.2.1.2 Mutationen im KRAS-Onkogen

30-50% aller KRK zeigen Mutationen im KRAS-Gen (Berg et al. 2010; Bos et al. 1987; Breivik et al. 1994; Brink et al. 2003; Finkelstein et al. 1993; Samowitz et al. 2001). Mutiertes KRAS befindet sich, durch Inaktivierung der GTPase-Aktivität, dauerhaft in der GTP-bindenden-Form und kann somit auch ohne vorgeschaltete Signaltransduktion ständig aktiv sein (Schubbert et al. 2007). Dies führt dazu, dass permanent wachstumsfördernde Signale, die zu Tumorentstehung, Tumorwachstum oder Metastasierung führen können, weitergeleitet werden. Mehr als 95% aller KRAS-Mutationen befinden sich an den kritischen Codons 12 oder 13, wobei Punktmutationen in Codon 12 beim KRK am häufigsten sind (Andreyev et al. 1998; Arrington et al. 2012; Kampman 2000).

### 1.2.2 Die Phosphatidylinositol-3-Kinasen

Die Phosphatidylinositol-3-Kinasen (kurz: PI3K) stellen eine Enzymfamilie dar, deren Mitglieder am Zellstoffwechsel und Zellwachstum beteiligt sind und auch bei der Zellmigration, Differenzierung und Apoptose eine wichtige Rolle spielen (Engelman et al. 2006; Vivanco und Sawyers 2002). Sie sind Bestandteil des PI3K/PTEN/AKT-Signalwegs, welcher zu den am häufigsten mutierten Signalwegen in Karzinomen gehört (Engelman et al. 2006).

#### 1.2.2.1 Struktur

Die Familie der PI3-Kinasen beinhaltet drei Klassen (Klasse I-III), die sich in Bezug auf ihre Struktur und Substratspezifität unterscheiden. Die Klasse I der PI3K lässt sich in IA und IB PI3K unterteilen (Domin und Waterfield 1997). Vor allem die Klasse IA PI3K spielen eine gesicherte Rolle in der Onkogenese verschiedener Karzinome (Vivanco und Sawyers 2002). Im Folgenden wird ausschließlich auf die für diese Arbeit relevante PI3K Klasse IA näher eingegangen. Eine schematische Darstellung der Domänenstruktur zeigt Abb. 3.

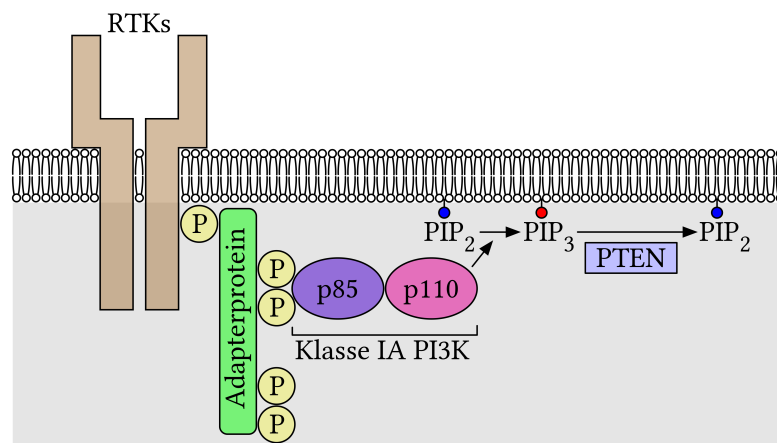


**Abb. 3: Domänenstruktur der PI3K Klasse IA.** Quelle: Eigene Darstellung, basierend auf (Vanhaesebroeck et al. 2010).

Die PI3K der Klasse IA sind Heterodimere, bestehend aus einer regulatorischen und einer katalytischen Untereinheit. Die drei verschiedenen zur Klasse IA gehörenden PI3-Kinasen unterscheiden sich durch die katalytische Untereinheit p110, die jeweils von einem der drei bekannten Gene ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ ) kodiert wird (Domin und Waterfield 1997; Vanhaesebroeck et al. 1997; Vanhaesebroeck et al. 2010; Vivanco und Sawyers 2002). Die katalytische Untereinheit besteht aus einer katalytischen Region, einer C2-Region, einer Helikasregion, einer p85-bindenden Region und einer RAS-bindenden Region. Die regulatorische Untereinheit p85 wird ebenfalls von einem der drei Gene ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) kodiert und enthält neben der p110-bindenden Region zwei SH2-(Thiol-)Gruppen (Vivanco und Sawyers 2002).

### 1.2.2.2 Regulation und Signalweg

Die Aktivität der PI3K Klasse IA wird durch verschiedene Signalwege beeinflusst. Der p85-p110 Komplex der PI3K liegt im Zytoplasma ruhender Zellen inaktiv vor. Werden Tyrosinkinasen der Zelle, wie beispielsweise EGFR, durch Liganden aktiviert, autophosphorylieren sie Tyrosinreste (Brazil und Hemmings 2001). Die regulatorische p85 Untereinheit der PI3K agiert entweder direkt oder mit Hilfe von Adapterproteinen, wie beispielsweise dem Insulin-Rezeptor-Substrat-1 (kurz: IRS-1), mit den phosphorylierten Tyrosinresten vieler aktivierter Tyrosinkinasen (Engelman et al. 2006; Samuels et al. 2005). Durch diese Interaktion gelangt die katalytische p110 Untereinheit der PI3K in die räumliche Nähe zu ihren Substraten, den Phospholipiden der Zellmembran (Engelman et al. 2006; Vivanco und Sawyers 2002). Eine schematische Darstellung findet sich in Abb. 4.



**Abb. 4: Schematische Darstellung des Mechanismus der Aktivierung der PI3K der Klasse IA.**

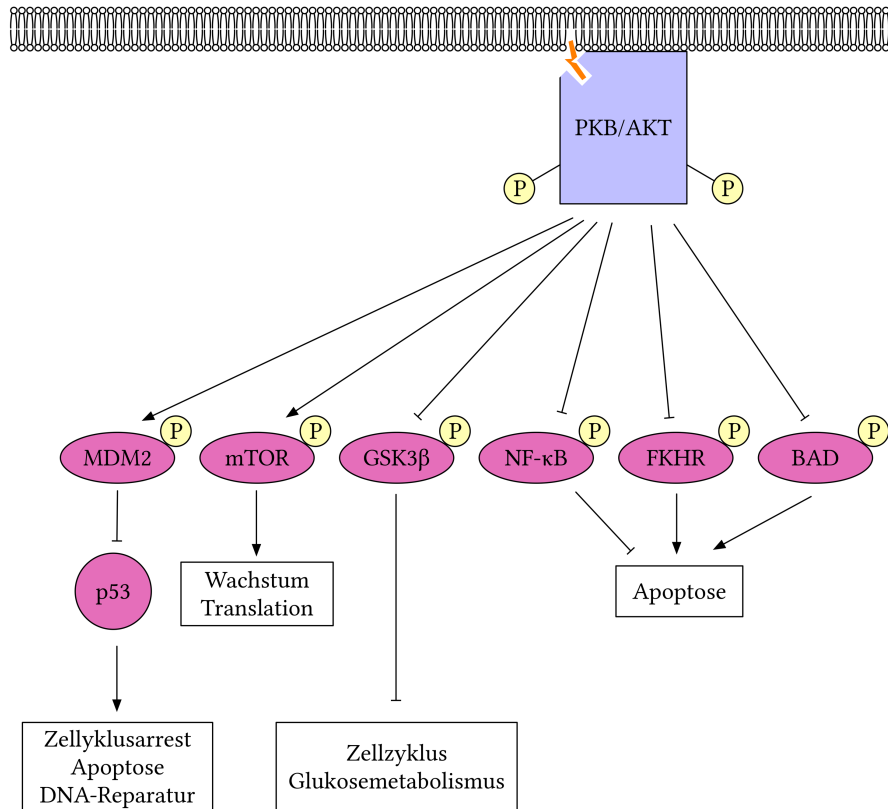
Quelle: Eigene Darstellung, basierend auf (Engelman et al. 2006).

Durch die katalytische Untereinheit der PI3K werden die 3'-OH-Gruppe von Phosphatidylinositolen an der Innenseite der Plasmamembran phosphoryliert (Engelman et al. 2006; Vivanco und Sawyers 2002). Es entsteht aus Phosphatidylinositol(3,4)bisphosphat (kurz: PIP<sub>2</sub>) der Second Messenger Phosphatidylinositol(3,4,5)trisphosphat (kurz: PIP<sub>3</sub>). Der Tumorsuppressor PTEN (Phosphatase and Tensin homolog) katalysiert die Rückreaktion (Vivanco und Sawyers 2002). Verschiedene intrazelluläre Proteine mit einer Pleckstrin Homology-Region (kurz: PH-Region), wie die Proteinkinase B (kurz: PKB; auch bekannt als AKT) oder die 3-Phosphoinositid-abhängige Proteinkinase-1 (kurz: PDK1), binden an diese phosphorylierten 3'-OH-Gruppen und werden aktiviert (Cantley 2002; Franke et al. 1995). Auf diesem Weg werden Signalwege, wie beispielsweise der AKT-Signalweg gestartet (Franke et al. 1995; Stephens et al. 1998).

Ein weiterer möglicher Weg der PI3K Aktivierung ist die Bindung von aktiven GTP-bindenden-RAS an die RAS-Region der katalytischen Untereinheit (Kodaki et al. 1994).

### 1.2.2.3 Der PI3K/AKT-Signalweg

Der PI3K/PTEN/AKT-Signalweg spielt eine wichtige Rolle bei der Weiterleitung intrazellulärer Prozesse zum Zellkern. Er ist beteiligt an der Regulierung von Genexpression, Angiogenese, Zellwachstum, Glykogensynthese, Proteinsynthese und Zellapoptose (Brazil und Hemmings 2001; McCubrey et al. 2006) und gehört zu den am häufigsten mutierten Signalwegen in Karzinomen (Engelman et al. 2006). PI3K sind an der Aktivierung der Proteinkinase B/AKT, die durch drei AKT-Gene codiert wird, beteiligt (Vivanco und Sawyers 2002). In der inaktiven Form befindet sich die PKB im Zytosol der Zelle. An das bei Aktivierung von PI3K generierte PIP<sub>3</sub> bindet die PKB mit der PH-Region. Dadurch kommt die PKB in die räumliche Nähe der Zellmembran und kann hier von PDK1 und einer Ser473-Kinase an Threonin 308 und Serin 473 phosphoryliert werden, sodass die volle Aktivität erlangt wird (Brazil und Hemmings 2001; Stephens et al. 1998). Die aktivierte PKB phosphoryliert ihre Substrate und aktiviert oder deaktiviert sie dadurch. Substrate für PKB/AKT sind, wie in Abb. 5 dargestellt, beispielsweise MDM2, mTOR, GSK3 $\beta$ , NF- $\kappa$ B, FKHR, BAD (Cross et al. 1995; Harris und Lawrence 2003; Mayo und Donner 2001; Vivanco und Sawyers 2002).



**Abb. 5: Schematische Darstellung der Signalwege ausgehend von PKB/AKT.** Quelle: Eigene Darstellung, basierend auf (Vivanco und Sawyers 2002).

Zusammenfassend bewirkt der AKT-Signalweg eine Apoptosehemmung und Zellwachstum (Vivanco und Sawyers 2002). AKT wird von Phosphatasen wie Proteinphosphatase 2A (kurz: PP2A) inaktiviert, indem pThr308 und pSer473 dephosphoryliert werden (Brazil und Hemmings 2001).

#### 1.2.2.4 Das PIK3CA-Gen

PIK3CA ist das Gen, das für die katalytische Untereinheit p110 $\alpha$  der PI3K Klasse IA kodiert (Engelman et al. 2006). PIK3CA wird eine Funktion als Protoonkogen in menschlichen Karzinomen zugesprochen (Samuels et al. 2005). Mutationen im PIK3CA-Gen finden sich bei verschiedenen Tumoren, wie beispielsweise beim Cervixkarzinom, hepatozellulärem Karzinom, Mammakarzinom, Magenkarzinom und nicht kleinzelligem Lungenkarzinom (Bader et al. 2005; Lee et al. 2005). Die Mutationsfrequenz im PIK3CA-Gen beim KRK liegt in verschiedenen Arbeiten zwischen 10-20% (Barault et al. 2008; Liao et al. 2012a; Prenen et al. 2009; Roock et al. 2010; Saridaki et al. 2011). Über 80% der Mutationen des PIK3CA-Gens befinden sich in den Exonen 9 und 20 des PIK3CA-Gens (Samuels et al. 2004; Ikenoue et al. 2005). Hierbei

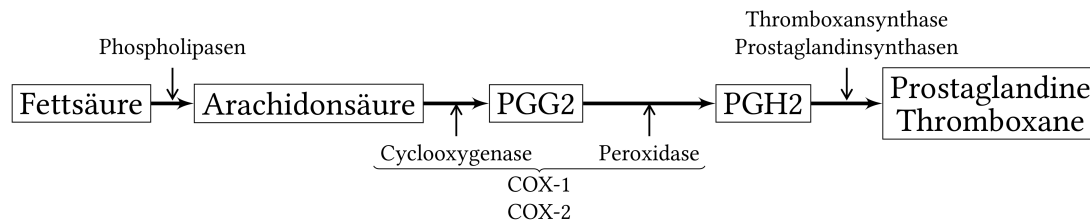
handelt es sich um Punktmutationen. Exon 9 codiert für die Helikalregion, Exon 20 für die Kinaseregion der katalytischen Untereinheit. Durch die Mutationen kommt es zu einer konstitutiv aktiven Lipid-Kinase-Aktivität (Ikenoue et al. 2005; Kang et al. 2005). Downstream Signalwege, wie der bereits beschriebene AKT-Signalweg, sind dadurch trotz Abwesenheit von Wachstumsfaktoren aktiv (Kang et al. 2005). Zusammenfassend führt demnach eine Mutation im PIK3CA-Gen von kolorektalen Karzinomzellen zu vermehrter Unabhängigkeit der Zellen von Wachstumsfaktoren, einer verminderten Apoptoserate und erleichterter Tumordinvasion (Samuels et al. 2005).

## **1.3 Cyclooxygenasen und ihre Inhibitoren**

Cyclooxygenasen (kurz: COX) sind als membrangebundene Enzyme an der Prostaglandinsynthese beteiligt (Smith 1989). Prostaglandine sind bei vielen biologischen Prozessen, wie beispielsweise der Ovulation, Angiogenese, Thrombozytenaggregation und bei Entzündungen beteiligt. Zudem spielen sie eine Rolle in der Karzinogenese (Williams et al. 1999).

### **1.3.1 Aufbau und Funktion**

Die COX befinden sich als homodimere Membranproteine in der Membran des endoplasmatischen Retikulums und in der Kernhülle. Sie haben eine molekulare Masse von 67-72 kDa (Garavito und DeWitt 1999; Smith et al. 1996). Jedes Monomer besitzt eine membranbindende Region, eine katalytische Region und eine epidermal growth factor-like Region (Garavito und DeWitt 1999). Die katalytische Region unterteilt sich in eine im hydrophoben Inneren des Enzyms gelegenen Cyclooxygenaseregion und eine luminal gelegenen Peroxydaseregion (Marshall und Kulmacz 1988). Cyclooxygenasen katalysieren den initialen Schritt, in dem Arachidonsäure über Prostaglandin  $G_2$  (kurz: PGG<sub>2</sub>) zu Prostaglandin  $H_2$  (kurz: PGH<sub>2</sub>) umgewandelt wird (Smith 1989). Eine schematische Darstellung ist Abb. 6 zu entnehmen. Im ersten Schritt werden der Arachidonsäure durch die Cyclooxygenase-Aktivität zwei Moleküle Sauerstoff angefügt sodass PGG<sub>2</sub> entsteht, dann erfolgt eine Reduktion zu PGH<sub>2</sub> mithilfe der Peroxidase-Aktivität. PGH<sub>2</sub> ist Ausgangssubstrat für die Synthese zahlreicher zellspezifischer Prostaglandine und Thromboxane (Williams et al. 1999).



**Abb. 6: Schematische Darstellung der Prostaglandinsynthese.** Quelle: Eigene Darstellung, basierend auf (Williams et al. 1999).

Es gibt zwei Isoformen der COX, die beide durch verschiedene Gene mit 60% Übereinstimmung codiert werden (Garavito und DeWitt 1999; Tazawa et al. 1994). Sie katalysieren die gleiche enzymatische Reaktion, unterscheiden sich aber unter anderem durch ihr Aktivitätsniveau. COX-1 wird in vielen Geweben, wie beispielsweise Niere, Lunge, Magen und Darm dauerhaft exprimiert, wohingegen COX-2 in den meisten Geweben nicht dauerhaft exprimiert wird, aber durch extrazelluläre und intrazelluläre Stimuli induzierbar ist. Zu diesen Stimuli gehören unter anderem Lipopolysaccharide, Interleukin-1, Tumornekrosefaktor, epidermaler Wachstumsfaktor (englisch: epidermal growth factor, kurz: EGF), Interferon- $\gamma$ , Endothelin und Arachidonsäure (Williams et al. 1999; Garavito und DeWitt 1999).

Die dauerhaft exprimierte COX-1 ist vor allem an der Zellhomöostase beteiligt wohingegen COX-2 eine Rolle bei Hyperalgesie, Entzündungen und Krebserkrankungen spielt (Rizzo 2011). COX-2 zeigt sich in einigen benignen Darmpolypen sowie in einem Großteil der kolorektalen Adenokarzinome überexprimiert (Eberhart et al. 1994). Experimentelle Studien haben gezeigt, dass eine Überexpression von COX-2 in Tumoren zu Dysregulationen in Zellwachstum und Proliferation, anhaltender Neovaskularisation, erhöhter Invasivität, verminderter Apoptose und disseminierten Metastasen führt (Rizzo 2011; Sheng et al. 2001; Sheng H et al. 1998; Tsujii M et al. 1997; Tsujii M et al. 1998; Tsujii M, DuBois RN. 1995).

### 1.3.2 COX-Inhibitoren

Nichtsteroidale Antirheumatika (kurz: NSAR) hemmen die Cyclooxygenaseaktivität der COX und somit die Bildung von PGG<sub>2</sub>. Diese Hemmung erfolgt entweder durch Modifizierung des Enzyms, wie bei Acetylsalicylsäure (kurz: ASS), oder durch kompetitive Hemmung, wie bei den meisten anderen nichtsteroidalen Antirheumatika (Williams et al. 1999). Die sauren NSAR binden beispielsweise an Arginin-120 und

inhibieren dadurch die COX. ASS inaktiviert die Cyclooxygenaseaktivität beider COX-Isoformen irreversibel, indem Serin-530 der COX-1 oder Serin-516 der COX-2 durch ASS acetyliert wird (Shimokawa and Smith 1992; Wennogle LP et al. 1995; Garavito und DeWitt 1999).

### **1.3.2.1 ASS in der Primär- und Sekundärprävention kardiovaskulärer Ereignisse**

ASS ist eines der meist verschriebenen Medikamente weltweit. Es wird zur symptomatischen Behandlung von Fieber und leichten bis mäßig starken Schmerzen angewendet. Zudem wird ASS in einer niedrigeren Dosierung (75-100mg/Tag) zur Thrombozytenaggregationshemmung eingesetzt. Durch eine ASS-Einnahme in der Sekundärprävention nach Herzinfarkt, Schlaganfall oder transitorisch ischämischer Attacke (kurz: TIA) zeigt sich ein, durch mehrere Studien belegtes, deutlich vermindertes Auftreten weiterer Herzinfarkte, Schlaganfälle und kardiovaskulär verursachter Todesfälle (Hennekens und Schneider 2008; Ittaman et al. 2014).

Der Stellenwert von ASS in der Primärprävention bei Patienten mit moderatem Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse wird, trotz Durchführung mehrerer großer Studien in den letzten 30 Jahren, nach wie vor kontrovers diskutiert (Belch et al. 2008; Fowkes et al. 2010; Ikeda et al. 2014; Ogawa et al. 2008; Peto et al. 1988; Ridker et al. 2005). Dem möglichen Nutzen stehen die Nebenwirkungen einer ASS-Therapie wie Magen- und Duodenalulcera, gastrointestinale Blutungen, Zahnfleischblutungen, Nasenbluten und schwerwiegende und lebensbedrohliche Blutungen, wie beispielsweise Hirnblutungen, gegenüber (Williams et al. 1999).

Zur weiteren Klärung der Fragestellung, ob ASS einen Stellenwert in der Primärprävention bei Patienten mit moderatem Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse hat, wurden 2018 drei große randomisierte Studien publiziert (Bowman et al. 2018; Gaziano et al. 2018; McNeil et al. 2018). Zwar führte ASS in diesen Studien zu einer (teilweise nicht signifikanten) Reduktion kardiovaskulärer Ereignisse, es zeigte sich allerdings ein erhöhtes Auftreten von Blutungskomplikationen. Ein signifikanter Unterschied im Gesamtüberleben konnte nicht gezeigt werden.

In der randomisierten (ASS versus (kurz: vs.) Placebo) ASPREE-Studie („Aspirin in Reducing Events in the Elderly trial“) mit über 19.000 Männern und Frauen über 70

Jahren ohne kardiovaskuläre Erkrankung konnte gezeigt werden, dass ASS in der Primärprävention zu einem signifikant erhöhten Blutungsrisiko führt und ASS das Risiko kardiovaskulärer Erkrankungen sowie das krankheitsfreie Überleben nicht signifikant senkt (McNeil et al. 2018).

In der randomisierten (ASS vs. Placebo) ASCEND-Studie („A Study of Cardiovascular Events in Diabetes“), in welche über 15.000 britische Diabetiker (94% Diabetes Typ 2) mit einem durchschnittlichen Alter von 63 Jahren eingeschlossen wurden, konnte gezeigt werden, dass ASS zu einer geringeren Rate an kardiovaskulären Ereignissen bei gleichzeitig erhöhter Rate an Blutungskomplikationen führt. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Gesamtmortalität. Insgesamt hoben sich die Vorteile und Risiken der ASS-Gabe auf (Bowman et al. 2018).

In die randomisierte (ASS vs. Placebo) ARRIVE-Studie („A Study to Assess the Efficacy and Safety of Enteric-Coated Acetylsalicylic Acid in Patients at Moderate Risk of Cardiovascular Disease“) wurden über 12.000 Männer über 55 Jahren und Frauen über 60 Jahren mit gewissen Risikoprofilen eingeschlossen. Dem nicht signifikanten Nutzen einer regelmäßigen ASS-Einnahme stand auch in der ARRIVE-Studie eine erhöhte Zahl von Blutungskomplikationen gegenüber. Auch hier konnte ein signifikanter Unterschied im Gesamtüberleben nicht gezeigt werden (Gaziano et al. 2018).

### **1.3.2.2 ASS in der Onkologie**

Mehrere Beobachtungsstudien, retrospektive Analysen und Metaanalysen kamen zu dem Ergebnis, dass durch eine langfristige, regelmäßige ASS-Einnahme sowohl die Inzidenz als auch die Mortalität des KHK gesenkt wird (Bains et al. 2016; Chan et al. 2007, 2009; Chubak et al. 2016; Cooper et al. 2010; Frouws et al. 2017a; García Rodríguez et al. 2017; Rothwell et al. 2010; Sung et al. 2018). Der protektive Effekt ist dabei abhängig von der Einnahmedauer und zeigt sich ab einer Einnahmedauer von 4-10 Jahren (Burn et al. 2011; Chan AT et al. 2005). In der ASPREE- und der ASCEND-Studie konnte in den aktuellen Auswertungen keine verminderte Inzidenz des KHK bei ASS-Einnahme gezeigt werden. Die Autoren führen hier als möglichen Grund die bis zum aktuellen Zeitpunkt vergleichsweise kurze Nachbeobachtungszeit an (Bowman et al. 2018; McNeil et al. 2018; Rothwell et al. 2010).



Zudem zeigten einige retrospektive Studien und Metaanalysen, dass eine regelmäßige ASS-Einnahme nach Diagnosestellung des KRK das Gesamtüberleben (englisch: Overall survival, kurz: OS) der Patienten verlängert (Bains et al. 2016; Coghill et al. 2011; Li et al. 2015; Liao et al. 2012a; Rothwell et al. 2010; Ye et al. 2014). Zu dieser Fragestellung gibt es mit der ASCOLT-Studie („Aspirin for Dukes C and High Risk Dukes B Colorectal Cancers“) und der Add-Aspirin zwei derzeit rekrutierende prospektive, randomisierte klinische Studien, die hoffentlich hierzu weitere Aussagen ermöglichen werden (Ali et al. 2011; Coyle et al. 2016).

Auf der Suche nach möglichen Biomarkern für eine adjuvante Therapie mit ASS nach Diagnosestellung eines KRK wurde PIK3CA als Biomarker in Erwägung gezogen (Domingo et al. 2013; Liao et al. 2012a; Reimers et al. 2014). Auch zahlreiche andere Parameter wie beispielsweise der humane Leukozytenantigen-Status (kurz: HLA-Antigen-Status) und die COX2-Expression, wurden in verschiedenen Studien als mögliche Biomarker für eine ASS-Therapie erwähnt (Chan et al. 2009; Chan et al. 2011; Liao et al. 2012a; Reimers et al. 2014).

Die genauen Mechanismen, wie ASS die Inzidenz und Mortalität von KRK senken, oder auch das OS bei Patienten mit KRK verlängern könnte, sind nicht geklärt. Die krebsprotektive und prognoseverbessernde Wirkung bei verschiedenen soliden Tumoren scheint einerseits über eine COX Hemmung, andererseits aber auch über COX unabhängige Signalwege vermittelt (Wu et al. 2010; Burn et al. 2011). In Tiermodellen konnte gezeigt werden, dass COX-Hemmer sowohl Tumorwachstum als auch Metastasierung beim KRK hemmen und das Überleben verlängern (Tomozawa et al. 1999; Yao et al. 2004). Zudem konnte experimentell demonstriert werden, dass eine Hemmung der COX-2, welche in einer Vielzahl der KRK überexprimiert ist, zu einer verminderten Produktion von Prostaglandin  $E_2$  (kurz: PGE<sub>2</sub>) führt, welches Zellmigration, Angiogenese und verminderte Apoptose begünstigt (Alfonso et al. 2014; Chan et al. 2007; Ferrández et al. 2012). Des Weiteren lassen experimentelle Daten vermuten, dass es durch die Hemmung der COX-1 und der damit einhergehenden Plättchenhemmung zu einer geringeren Rate an Fernmetastasierungen kommt (Gay und Felding-Habermann 2011; Rothwell et al. 2012).

## **1.4 Ausblick**

Verschiedene molekulare Tumoreigenschaften haben Einfluss auf das Ansprechen von Therapien bei Patienten mit KRK. Molekulare Biomarker sind daher wichtig, um Patienten zu identifizieren, die von bestimmten Therapien profitieren können. Bei der Therapie mit EGFR-Antikörpern konnte der KRAS-Mutationsstatus als wichtiger molekularer Biomarker identifiziert werden (siehe Kapitel 1.1.4.1).

Einige retrospektive Studien und Metaanalysen lassen vermuten, dass eine regelmäßige ASS-Einnahme nach Diagnosestellung des KRK das Gesamtüberleben der Patienten verlängern könnte (Bains et al. 2016; Coghill et al. 2011; Li et al. 2015; Liao et al. 2012a; Rothwell et al. 2010; Ye et al. 2014). Auf der Suche nach möglichen Biomarkern wurde der PIK3CA-Mutationsstatus als solcher in Erwägung gezogen (Liao et al. 2012a). Laut Studien von Liao et al. und Domingo et al. würden nur Patienten mit einer Mutation im PIK3CA-Gen der Tumorzellen von einer regelmäßigen ASS-Einnahme nach Diagnosestellung des KRK profitieren (Domingo et al. 2013; Liao et al. 2012a). Dieses konnte allerdings von einigen weiteren Studien nicht untermauert werden (Kothari et al. 2015; Murphy et al. 2017; Reimers et al. 2014). Daher beschäftigt sich diese Arbeit mit der Fragestellung, ob der PIK3CA-Mutationsstatus oder aber auch der KRAS-Mutationsstatus geeignete molekulare Biomarker für eine „adjuvante“ ASS-Therapie bei Patienten mit KRK darstellen.

## 2. Zielsetzung

Ergebnisse verschiedener Arbeiten lassen vermuten, dass Patienten mit einem KRK von der „adjuvanten“ Einnahme von ASS profitieren könnten. Es stellt sich daher die Frage, ob es Patienten gibt, die aufgrund ihrer molekularen Tumoreigenschaften nicht von der Einnahme von ASS profitieren würden und nur dem Risiko unerwünschter Nebenwirkungen ausgesetzt wären.

Der PIK3CA-Mutationsstatus wurde als möglicher molekularer Biomarker für eine „adjuvante“ ASS-Therapie beim KRK in Erwägung gezogen. Die Ergebnisse aktueller Arbeiten sind diesbezüglich widersprüchlich.

Ziel dieser Arbeit ist es, die Rolle vom PIK3CA-Mutationsstatus im Hinblick auf eine prognoseverbessernde Wirkung von ASS bei Patienten mit KRK zu untersuchen. Als Endpunkt wurde das 10-Jahres-Gesamtüberleben gewählt. Im speziellen sollen folgende Fragestellungen beantwortet werden:

- Wie hoch ist die Mutationsfrequenz im PIK3CA-Gen im untersuchten Patientenkollektiv?
- Inwiefern beeinflusst eine Mutation im PIK3CA-Gen der Tumorzellen das 10-Jahres-Gesamtüberleben der Patienten?
- Führt die regelmäßige Einnahme von ASS im Gesamtkollektiv der Patienten zu einem veränderten 10-Jahres-Gesamtüberleben?
- Hat eine Mutation im PIK3CA-Gen von Tumorzellen bei Einnahme von ASS einen Einfluss auf das 10-Jahres-Gesamtüberleben der Patienten?
- Hat eine Mutation im KRAS-Gen von Tumorzellen bei Einnahme von ASS einen Einfluss auf das 10-Jahres-Gesamtüberleben der Patienten?

### 3. Patienten, Materialien und Methoden

Für die Erstellung dieser Arbeit wurden die im Folgenden aufgeführten Laborgeräte, Chemikalien, Enzyme, Kits, Labormaterialien, Primer und Zelllinien verwendet.

#### 3.1 Laborgeräte

Die in dieser Arbeit verwendeten Laborgeräte und ihre Hersteller sind Tab. 3 zu entnehmen.

Tab. 3: Verwendete Laborgeräte.

<b>Gerät</b>	<b>Hersteller</b>
<b>Blockthermostat BT 100</b>	Kleinfeld Labortechnik (Gehrden)
<b>Gefrierschrank Forschungslabor</b>	Kirsch (Willstätt-Sand)
<b>Gefrierschrank Pathologie</b>	Liebherr (Lindau)
<b>Gefrierschrank Routinelabor</b>	Liebherr (Lindau)
<b>Kühlschrank Forschungslabor</b>	Kirsch (Willstätt-Sand)
<b>Lichtmikroskop</b>	Leica (München)
<b>Mikrotom SM2000</b>	Leica (München)
<b>Paraffin-Streckbad GFL-1052</b>	GFL (Burgwedel)
<b>PyroMark Q24 Vacuum Prep Through</b>	Qiagen (Hilden)
<b>Pyrosequenzer PyroMark Q24</b>	Qiagen (Hilden)
<b>Spectrophotometer ND-1000</b>	Peqlab (Darmstadt)
<b>Thermal-Cycler T100</b>	Bio Rad (München)
<b>Thermomixer 5436</b>	Eppendorf (Wesseling-Berzdorf)
<b>Thermomixer Comfort</b>	Eppendorf (Wesseling-Berzdorf)
<b>Trockenschrank Pathologie</b>	Heraeus Instruments (Dreieich)
<b>Vacuum Workstation PyroMark Q24</b>	Qiagen (Hilden)
<b>Vortexer Reax</b>	Heidolph Instruments (Schwabach)
<b>Wärmeschrank Routinelabor</b>	Memmert (Schwabach)
<b>Zentrifuge 5417C</b>	Eppendorf (Wesseling-Berzdorf)

## 3.2 Chemikalien und Enzyme

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und Enzyme und ihre Hersteller sind Tab. 4 zu entnehmen.

Tab. 4: Verwendete Chemikalien und Enzyme.

Name	Hersteller
dNTPs	Life Technologies (Darmstadt)
Ethanol	Sigma-Aldrich GmbH (Steinheim)
Magnesiumchlorid	Life Technologies (Darmstadt)
PCR-Puffer	Life Technologies (Darmstadt)
Platinum-Taq.	Life Technologies (Darmstadt)
PyroMark® Annealing Buffer	Qiagen (Hilden)
PyroMark® Binding Buffer	Qiagen (Hilden)
PyroMark® Denaturation Sol.	Qiagen (Hilden)
PyroMark® Wash Buffer	Qiagen (Hilden)
RNase freies Wasser	Roth (Karlsruhe)
Streptavidin Sepharose® High Perfomence (beads)	GE Healthcare (Solingen)
Xylol	Sigma-Aldrich GmbH (Steinheim)

## 3.3 Kits

Die in dieser Arbeit verwendeten Kits und ihre Hersteller sind Tab. 5 zu entnehmen.

Tab. 5: Verwendete Kits.

Name	Hersteller
PyroMark® Gold Q24 Reagents	Qiagen (Hilden)
QIAamp DNA Mini Kit	Qiagen (Hilden)

### 3.4 Labormaterialien

Die in dieser Arbeit verwendeten Labormaterialien und ihre Hersteller sind Tab. 6 zu entnehmen.

Tab. 6: Verwendete Labormaterialien.

<b>Material</b>	<b>Hersteller</b>
<b>24-Well Platte</b>	Greiner Bio-One (Frickenhausen)
<b>Einwegskalpell</b>	Braun (Melsungen)
<b>Mikrotommesser</b>	Feather (Seki)
<b>Objektträger</b>	R. Langenbrinck (Emmendingen)
<b>PCR-SoftTube</b>	Biozym (Hessisch Oldendorf)
<b>Permanentmarker</b>	Staedler (Nürnberg)
<b>Pipetten Forschungslabor, verschieden Volumina</b>	Gilson Diamond (Middleton)
<b>Pipetten Pathologie, verschieden Volumina</b>	Eppendorf (Hamburg)
<b>Pipetten Routinelabor, verschiedene Volumina</b>	Gilson Diamond (Middleton)
<b>Pipettenspitzen</b>	Sarstedt (Nürnbrecht)
<b>Pipettenspitzen</b>	Greiner Bio-One (Frickenhausen)
<b>PyroMark Q24 Cartridge</b>	Qiagen (Hilden)
<b>PyroMark Q24 Plate</b>	Qiagen (Hilden)
<b>Safe-Lock Tubes, verschiedene Größen (0,5ml; 1,5ml; 2,0ml)</b>	Eppendorf (Hamburg)

### 3.5 Verwendete Primer

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten PCR-Primer wurden einem Paper von Nosho et al. entnommen und von der Firma Eurofins bezogen (Nosho et al. 2008). In Tab. 7 sind die Primersequenzen aufgeführt.

Tab. 7: Sequenzen und Hersteller der verwendeten PCR-Primer.

Primername	Gen	Sequenz	Hersteller
<b>PIK3CA 9-Forward</b>	PIK3CA Exon 9	5'BIO-aacagctcaaagcaatttctacacg-3'	Eurofins (Ebersberg)
<b>PIK3CA 9-Reverse</b>	PIK3CA Exon 9	5'-acctgtgactccatagaaaatcttt-3'	Eurofins (Ebersberg)
<b>PIK3CA 20-Forward</b>	PIK3CA Exon 20	5'BIO-caagaggcttggagtatttca-3'	Eurofins (Ebersberg)
<b>PIK3CA 20-Reverse</b>	PIK3CA Exon 20	5'-caatccattttgtgtcca-3'	Eurofins (Ebersberg)

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Sequenzierprimer wurden ebenfalls einem Paper von Nosho et al. entnommen und von der Firma Eurofins bezogen (Nosho et al. 2008). In Tab. 8 sind die Primersequenzen aufgeführt.

Tab. 8: Sequenzen und Hersteller der verwendeten Sequenzierprimer.

Primername	Gen	Sequenz	Hersteller
<b>9-RS1</b>	PIK3CA Exon 9	5'-ccatagaaaatcttctcct-3'	Eurofins (Ebersberg)
<b>9-RS2</b>	PIK3CA Exon 9	5'-tagaaaatcttctcctgct-3'	Eurofins (Ebersberg)
<b>9-RS3</b>	PIK3CA Exon 9	5'-ttctccttgcttcagtgattt-3'	Eurofins (Ebersberg)
<b>20-RS</b>	PIK3CA Exon 20	5'-gttgtccagccacca-3'	Eurofins (Ebersberg)

### **3.6 Zelllinien**

In dieser Arbeit wurden zwei Zelllinien mit Mutationen im PIK3CA-Gen als Positivkontrollen verwendet. Abstammung, Herkunft und Medium der Zelllinien sind in Tab. 9 aufgeführt.

**Tab. 9: Abstammung, Herkunft und Medium der verwendeten Zelllinien mit Mutation im PIK3CA-Gen.**

<b>Zelllinie</b>	<b>Abstammung</b>	<b>Herkunft</b>	<b>Medium</b>	<b>Mutation</b>
<b>MCF-7</b>	Breast Andeno-CA	DSMZ (ACC 115)	RPMI 1640+1% Penicilin/Streptomycin +10% FBS	Exon 9 PIK3CA-Gen
<b>SKOV-3</b>	Ovarial-CA	ATCC (HTB-77)	McCoy's 5a Medium +10%FBS+1%Penicillin/ Streptomycin	Exon 20 PIK3CA-Gen

### **3.7 Patienten**

#### **3.7.1 Patientenrekrutierung**

Es handelt sich um eine retrospektive, unizentrische Analyse. Alle Patienten, die in den Jahren 2003 und 2004 an einem KRK im Universitätsklinikum Marburg operiert worden waren, wurden anhand von Dokumentationslisten der Pathologie ermittelt. Patienten konnten, nach Rücksprache mit der Ethikkommission, ohne vorliegende Einwilligung nur mit Diagnose vor dem Jahr 2005 eingeschlossen werden. Insgesamt konnten 153 Patienten in die Arbeit eingeschlossen werden. Bei diesen 153 Patienten standen die für diese Arbeit benötigten klinischen Informationen zur Verfügung und das Material aus der Pathologie war für die Pyrosequenzierung geeignet. Es wurden Patienten mit UICC-Stadium I-IV eingeschlossen, Patienten mit Stadium IV allerdings nur, wenn resektable Lebermetastasen vorlagen. Patienten mit Zweitkarzinomen wurden ausgeschlossen. In Abb. 7 sind die Auswahlkriterien der Patienten im Flussdiagramm dargestellt.



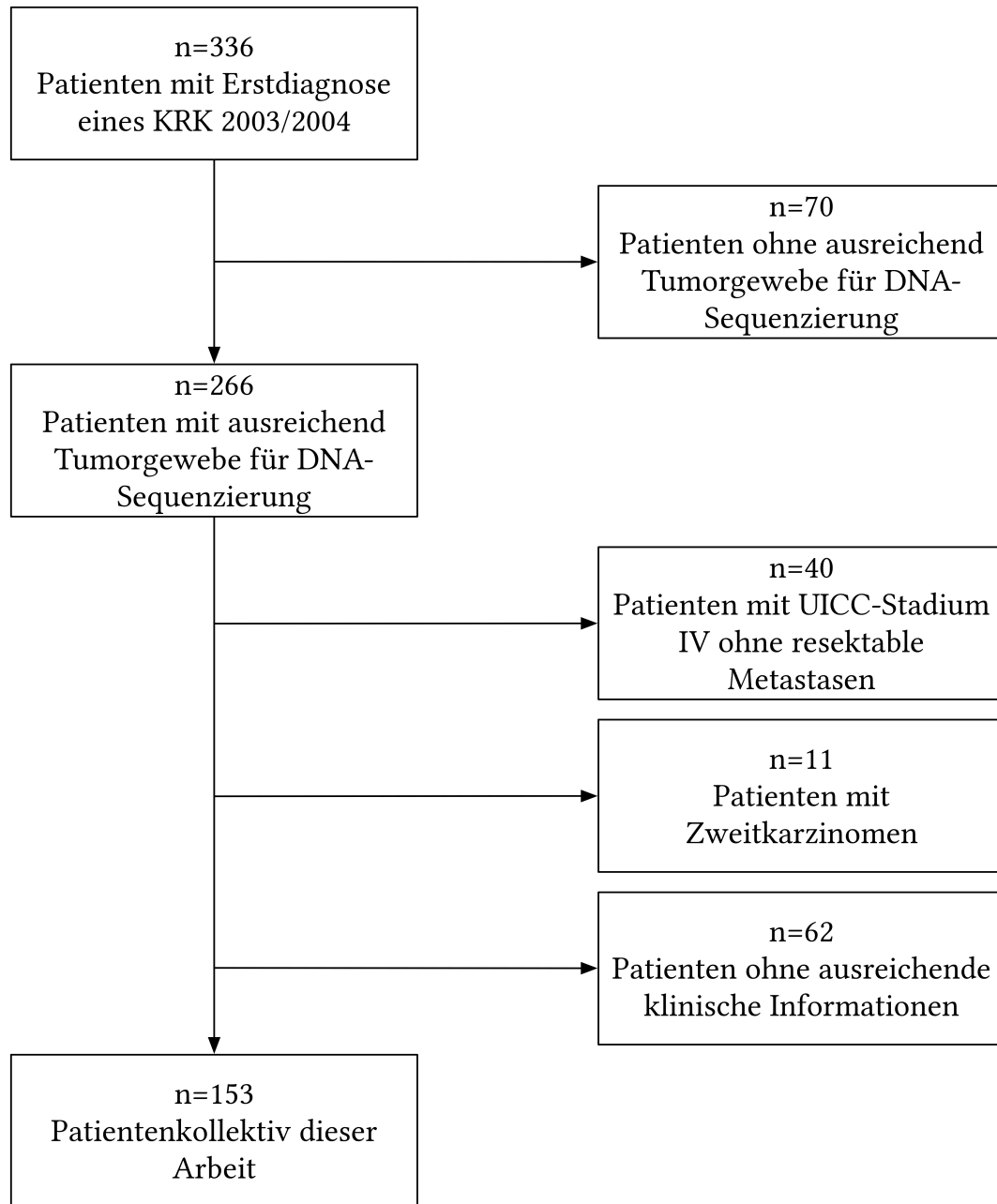


Abb. 7: Flussdiagramm Patientenkollektiv dieser Arbeit.

### 3.7.2 Klinische Informationen

Zur Verfügung standen auf Grund der Dokumentationslisten der Abteilung für Pathologie des Universitätsklinikum Marburg der Entnahmeterrmin der Tumorprobe, der Patientenname, das Patientengeburtsdatum, das Geschlecht, die Patienten-Identifikationsnummer (kurz: PID-Nr.) sowie die Fall-Nummer. Weitere Informationen konnten mit Hilfe der PID-Nr. den Patientenakten entnommen werden. Außerdem bestand die Möglichkeit, Hausärzte und anderer Ärzte der Patienten sowie das Einwohnermeldeamt zu kontaktieren.

### 3.7.2.1 Ermittlung des Diagnosezeitpunktes, der Tumorart, der TNM-Klassifikation und des Gratings

Anhand von Arztbriefen, Operationsberichten und Pathologieberichten wurden der Diagnosezeitpunkt, die Tumorart, die TNM-Klassifikation und das Grading ermittelt.

### 3.7.2.2 Ermittlung des Todeszeitpunktes oder des Überlebens

Ob ein Patient im für diese Arbeit relevanten Zeitraum von zehn Jahren nach Diagnosestellung des KRK verstorben war oder ob er zehn Jahre nach Diagnosestellung des KRK am Leben war, wurde indirekt aus Patientenakten oder direkt durch Anfrage an das zuständige Einwohnermeldeamt ermittelt. Die Todesursache wurde nicht ermittelt. Tab. 10 sind die entsprechenden Kriterien zu entnehmen.

**Tab. 10: Kriterien zur Ermittlung des 10-Jahres-Überlebens.**

10-Jahres-Überleben	Kriterien
Ja	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Der Patient wurde zu einem Zeitpunkt &gt;10 Jahre nach Diagnosestellung des KRK im Universitätsklinikum Marburg behandelt. Dies ist durch einen Arztbrief/Akteneintrag belegt.</li> </ul> <p>und/oder</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Der Patient ist zu einem Zeitpunkt &gt;10 Jahre nach Diagnosestellung des KRK im Universitätsklinikum Marburg verstorben. Dies ist durch einen Arztbrief/Akteneintrag belegt.</li> </ul> <p>und/oder</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Der Patient war zu einem Zeitpunkt &gt;10 Jahre nach Diagnosestellung des KRK in Behandlung beim Hausarzt. Dies ist durch einen Akteneintrag belegt.</li> </ul> <p>und/oder</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Das vom Hausarzt genannte Sterbedatum war zu einem Zeitpunkt &gt;10 Jahre nach Diagnosestellung des KRK. Dies ist durch einen Akteneintrag belegt.</li> </ul> <p>und/oder</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Bei Anfrage des Einwohnermeldeamtes war der Patient zu einem Zeitpunkt &gt;10 Jahre nach Diagnosestellung des KRK gemeldet.</li> </ul>

<b>Nein</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Der Patient ist zu einem Zeitpunkt &lt;10 Jahre nach Diagnosestellung des KRK im Universitätsklinikum Marburg verstorben. Dies ist durch einen Arztbrief/Akteneintrag belegt.</li> </ul> und/oder <ul style="list-style-type: none"> <li>- Das vom Hausarzt genannte Sterbedatum war zu einem Zeitpunkt &lt;10 Jahre nach Diagnosestellung des KRK. Dies ist durch einen Akteneintrag belegt.</li> </ul> und/oder <ul style="list-style-type: none"> <li>- Bei Anfrage des Einwohnermeldeamtes war der Patient zu einem Zeitpunkt &lt;10 Jahre nach Diagnosestellung des KRK verstorben.</li> </ul>
-------------	--

### 3.7.2.3 Ermittlung des ASS-Einnahmestatus

Ob ein Patient seit Diagnosezeitpunkt des KRK regelmäßig ASS eingenommen hatte oder ob keine regelmäßige ASS-Einnahme erfolgte, wurde mit Hilfe von Daten aus der Patientenakte und durch Kontaktaufnahme zu Hausärzten ermittelt. Tab. 11 sind die entsprechenden Kriterien zu entnehmen. Patienten mit fraglichen oder unbekannten ASS-Einnahmestatus wurden aus der Analyse ausgeschlossen.

Tab. 11: Kriterien zur Ermittlung des ASS-Einnahmestatus.

<b>Regelmäßige ASS-Einnahme</b>	<b>Kriterien</b>
<b>Ja</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Die regelmäßige ASS-Einnahme an den überwiegenden Tagen innerhalb von 10 Jahren nach Diagnosestellung des KRK bzw. bis zum Tod des Patienten konnte durch mehrere Krankenakteneinträge des Universitätsklinikum Marburg belegt werden. Der Patient hatte eine Indikation für die tägliche ASS-Einnahme.</li> </ul> und/oder <ul style="list-style-type: none"> <li>- Die regelmäßige ASS-Einnahme an den überwiegenden Tagen innerhalb von 10 Jahren nach Diagnosestellung des KRK bzw. bis zum Tod des Patienten konnte durch mehrere Krankenakteneinträge des Hausarztes belegt werden. Der Patient hatte eine Indikation für die tägliche ASS-Einnahme.</li> </ul> und/oder <ul style="list-style-type: none"> <li>- ASS wurde dem Patienten von einem behandelnden Arzt innerhalb von 10 Jahren nach Diagnosestellung des KRK bzw. bis zum Tod regelmäßig rezeptiert.</li> </ul>

---

<b>Nein</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Eine regelmäßige ASS-Einnahme an den überwiegenden Tagen innerhalb von 10 Jahren nach Diagnosestellung des KRK war nicht nachweisbar. In den Krankenakten des Universitätsklinikums Marburg waren keine ASS-Einnahme sowie kein Grund für eine mögliche ASS-Einnahme vermerkt.</li> </ul>
und	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Eine regelmäßige ASS-Einnahme an den überwiegenden Tagen innerhalb von 10 Jahren nach Diagnosestellung des KRK war nicht nachweisbar. In den Krankenakten des Hausarztes waren keine ASS-Einnahme sowie kein Grund für eine mögliche ASS-Einnahme vermerkt.</li> </ul>
und	<ul style="list-style-type: none"> <li>- ASS wurde dem Patienten von einem behandelnden Arzt innerhalb von 10 Jahren nach Diagnosestellung des KRK bzw. bis zum Tod nicht regelmäßig rezeptiert.</li> </ul>

---

## **3.8 Methoden**

### **3.8.1 DNA-Isolation**

Die Isolation der Desoxyribonukleinsäure (kurz: DNA) aus in Paraffin eingebettetem Tumorgewebe erfolgte nach bereits zuvor im Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Marburg und im Labor für Hämatologie und Onkologie des Universitätsklinikums Marburg etablierten Vorgehensweisen/Methoden.

#### **3.8.1.1 Tumorproben der Patienten**

Die Tumorgewebeproben des KRK wurden, in Form von Paraffinblöcken und schon aus diesen Paraffinblöcken angefertigten und durch Periodik Acid Schiff Reaktion (kurz: PAS) gefärbten und auf Objektträgern aufgezogenen Schnitten, aus dem Archiv der Pathologie des Universitätsklinikums Marburg rekrutiert.

#### **3.8.1.2 Anfertigung von Schnitten eines Paraffinblockes**

Der Paraffinblock wurde im Gefrierschrank auf -20°C heruntergekühlt. Anschließend erfolgte die Einspannung des Blockes im Schlittenmikrotom. Nach Erstellen einer planaren Oberfläche durch Probeschnitte wurden mit Hilfe des Mikrotoms je Block drei 5µm dünne Schnitte angefertigt. Diese wurden in ein erwärmtes Wasserbad überführt

und anschließend jeweils auf einen Objektträger aufgezogen. Im Wärmeschrank erfolgte die Trocknung, sodass der Paraffinschnitt durch elektrostatische Wechselwirkungen am Objektträger haftete.

### 3.8.1.3 Entparaffinierung der Gewebeschnitte

Das Gewebe, welches elektrostatisch an den Objektträgern haftete, wurde im Objektträgerhalter mithilfe von Xylol entparaffiniert und durch eine absteigende Alkoholreihe rehydriert. Die Schnitte wurden jeweils dreimal 10 Minuten in 100%iges Xylol, zweimal 5 Minuten in 100%iges Ethanol, zweimal 5 Minuten in 96%iges Ethanol und zweimal 5 Minuten in 70%iges Ethanol getaucht. Anschließend wurde das Gewebe mit entionisiertem Wasser gespült.

### 3.8.1.4 Isolierung des Tumorgewebes aus entparaffinierten Gewebeschnitten

Mit Hilfe eines Lichtmikroskops wurde die Tumorregion des PAS-Schnittes aufgesucht und anschließend mit einem Permanentmarker auf dem Deckplättchen markiert. Die PAS-Schnitte mit der markierten Tumorregion dienten als Vorlage zur Mikrodisektion. Unter Zuhilfenahme des gefärbten Schnittes desselben Paraffinblockes wurde das Tumorgewebe mithilfe eines sterilen Skalpells vom Objektträger gelöst und in ein 1,5ml Eppendorfgefäß zur Weiterverarbeitung überführt.

### 3.8.1.5 DNA-Extraktion aus aufgearbeiteten Schnitten über Silicasäulen

Die DNA-Extraktion aus dem Tumorgewebe erfolgte mit Hilfe des QIAamp DNA Mini Kit von Qiagen und einer standardisierten Methodik des Labors für Hämatologie und Onkologie des Universitätsklinikums Marburg. Die Tab. 12 zeigt die Bestandteile des verwendeten QIAamp DNA Mini Kit.

**Tab. 12: Bestandteile des QIAamp DNA Mini Kit von Qiagen.**

<b>QIAamp DNA Mini Kit</b>	
<b>Anzahl der Proben</b>	250
<b>QIAamp spin columns</b>	250
<b>Collection tubes (2ml)</b>	750
<b>Buffer AL</b>	54ml
<b>Buffer ATL</b>	50ml

<b>Buffer AW1</b>	95ml
<b>Buffer AW2</b>	66ml
<b>Buffer AE</b>	110ml
<b>Proteinase K</b>	6ml

Zu dem im 1,5ml Eppendorfgefäß befindlichen entparaffinierten Tumorgewebe wurden 250µl Tissue-Lysis-Puffer (kurz: ATL-Puffer) und 20µl Proteinase K gegeben. Nach dem Vortexen erfolgte zur Verdauung des Gewebes eine Inkubation über Nacht im Wärmeschrank (55°C). Am nächsten Tag erfolgte nach Hinzugabe von 200µl Lysispuffer (kurz: AL-Puffer) eine Inkubation der Proben für 10 Minuten bei 70°C im Thermoblock. Anschließend wurden 200µl Ethanol hinzu pipettiert, um dann den gesamten Inhalt des Eppendorfgefäßes auf eine Silicasäule zu pipettieren. Nach einem einminütigen Zentrifugieren bei 6000g wurde die Silicasäule in ein 2ml Eppendorfgefäß überführt, um anschließend 500µl Waschpuffer AW1 auf die Säule zu pipettieren. Es erfolgte ein erneutes Zentrifugieren für eine Minute bei 6000g und die Silicasäule wurde wieder in ein 2ml Eppendorfgefäß überführt. Anschließend wurden 500µl Waschpuffer AW2 auf die Säule pipettiert und es erfolgte ein dreiminütiges Zentrifugieren bei 19900g. Die Säule wurde wiederum in ein 2ml Eppendorfgefäß überführt und anschließend für eine Minute bei 19900g zentrifugiert. Nach Überführen der Säule in ein 1,5ml Eppendorfgefäß wurden 35µl RNase freies Wasser direkt auf die Silicasäule pipettiert. Nach einer Inkubation von einer Minute bei 70°C im Wärmeschrank erfolgte ein Zentrifugieren für eine Minute bei 6000g. Die Silicasäule wurde anschließend verworfen und die Lagerung der sich nun im Eppendorfgefäß befindlichen genomischen DNA erfolgte bis zur weiteren Verwendung bei -20°C.

#### 3.8.1.6 Konzentrationsbestimmung und Verdünnung der Nukleinsäurelösung

Um die Güte der gewonnen Proben ermitteln zu können, wurde mit dem NanoDrop-Spektrophotometers die DNA-Konzentration der einzelnen Proben bei einer Wellenlänge von 260nm bestimmt. Hierbei sollte das Verhältnis der Extensionen bei 260nm und 280nm für DNA 1,8 betragen, da sonst der Verdacht auf eine Verunreinigung der Probe, beispielsweise mit Lösungsmittelresten, Reagenzien oder Proteinen, bestanden hätte. Anschließend wurden die Proben mit destilliertem Wasser verdünnt, sodass jede Probe einen DNA-Gehalt von 50nM hatte. Die Lagerung der Proben erfolgte bis zur weiteren DNA-Analyse bei -20°C.

### 3.8.2 Polymerase-Ketten-Reaktion

Zur Vervielfältigung der zu analysierenden DNA-Abschnitte erfolgte die Polymerase-Ketten-Reaktion (englisch: polymerase chain reaction, kurz: PCR).

#### 3.8.2.1 Prinzip

Mit Hilfe der PCR kann eine exponentielle Vervielfältigung von DNA-Abschnitten erfolgen. Durch eine mehrfache Wiederholung der drei Reaktionsschritte Denaturierung, Primerhybridisierung und Elongation (Zyklus) nach einem festgelegtem Temperatur- und Zeitschema erfolgt die Vervielfältigung. Den ersten Reaktionsschritt stellt die Denaturierung dar. Durch eine Erhitzung der DNA-Moleküle trennen sich hierbei die komplementären DNA-Stränge. Durch Absenken der Temperatur erfolgt im zweiten Schritt die Primerhybridisierung (Annealing) an spezifische DNA-Abschnitte der Einzelstränge. Während der anschließenden Elongation erstellt die Taq-(*Thermus aquaticus*) Polymerase bei einer festgelegten Temperatur ausgehend vom Primer, durch den Einbau komplementärer Nukleotide an die freie 3'-OH-Stelle, einen komplementären Strang. Die Reaktionsschritte werden anschließend in mehreren Zyklen wiederholt. Die Auswahl des Primers erfolgt entsprechend des gewünschten zu vervielfältigenden DNA-Abschnittes.

#### 3.8.2.2 Durchführung

In dieser Arbeit wurde für jede Patientenprobe das Exon 9 sowie das Exon 20 des PIK3CA-Gens amplifiziert. Hierfür wurden die flankierenden Primer der bereits zuvor im Abschnitt Material und Methoden abgebildeten Tab. 7 verwendet. Die Primer wurden aus einem Paper von Nosho et al. entnommen (Nosho et al. 2008). Die Durchführung erfolgte nach einer standardisierten Methodik des Labors für Hämatologie und Onkologie des Universitätsklinikums Marburg. Der Mastermix für die PCR wurde nach dem Schema der Tab. 13 in ein 1,5ml Eppendorfgefäß pipettiert. Hierbei wurden entweder die beiden Primer für Exon 9 oder die beiden Primer für Exon 20 verwendet.

Tab. 13: Pipettierschema für den PCR-Mastermix.

Substrat	Menge
H <sub>2</sub> O	36µl
10xPCR-Puffer (ohne MgCl <sub>2</sub> )	5µl
MgCl <sub>2</sub>	1,5µl
dNTPs	1µl
For.-Biot-Primer Exon 9 oder Exon 20	1µl
Rev.-Primer Exon 9 oder Exon 20	1µl
Platinum-Taq.	0,5µl
<b>Total</b>	<b>46µl</b>

Anschließend wurden 46µl Mastermix und 4µl der DNA einer Patientenprobe in ein PCR-Tube pipettiert und in den Thermocycler gestellt. Im Thermocycler erfolgen die unter Kapitel 3.8.2.1 erwähnten Reaktionsabläufe. Die PCR Bedingungen waren bereits im Labor etabliert und sind Tab. 14 zu entnehmen. Jeder PCR-Durchlauf wurde mit einer Positivkontrolle (Zelllinie, Tab. 9) und einer Negativkontrolle (Wasser) durchgeführt.

Tab. 14: PCR-Programm.

Wiederholungen	Temperatur	Dauer
1	95°C	5:00 Minuten
50	94°C	0:20 Minuten
	50°C	0:20 Minuten
	74°C	0:40 Minuten
1	72°C	1:00 Minuten
1	12°C	∞

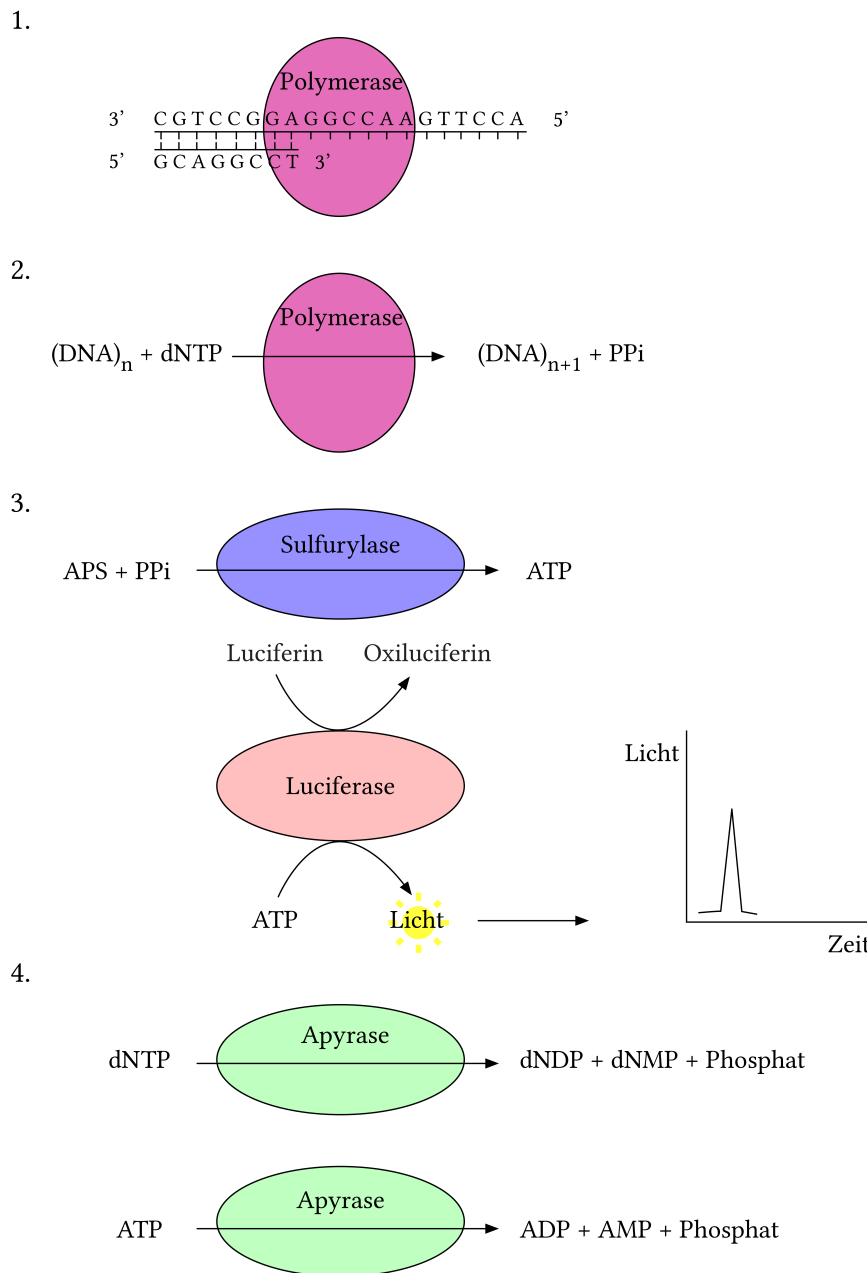
### 3.8.3 Pyrosequenzierung

Zur Mutationsanalyse des PIK3CA-Gens wurde die Pyrosequenzierung verwendet. Es erfolgte die Analyse der Mutationen im Exon 9 (c.1624G>A; c.1633G>A; c.1634A>G; c.1636C>A) und im Exon 20 (c.3140A>G; c.3140A>T; c.3139C>T; c.3129G>T).



### 3.8.3.1 Prinzip

Die Pyrosequenzierung ist eine Methode, die zum Nachweis bekannter Mutationen geeignet ist. Zur Mutationsanalyse im Pyrosequenzer sind mehrere Reaktionsschritte erforderlich. Zunächst müssen die zu analysierende DNA, der Sequenzierprimer, die Enzyme DNA-Polymerase, ATP-Sulfurylase, Luciferase und Apyrase, die Substrate Adenosin-5'-phosphosulfat (kurz: APS) und Luciferin sowie die Desoxyribonukleotid-Triphosphate (dNTP) in die vorgesehenen Positionen des Pyrosequenzer pipettiert werden. Anschließend kann die Pyrosequenzierung gestartet werden. An die Einzelstrang-DNA bindet der Sequenzierprimer und der Pyrosequenzer injiziert das erste dNTP. Die dNTPs werden einzeln nacheinander injiziert und die Reihenfolge der dNTPs wird so festgelegt, dass bei Mutation immer ein verschobenes Leseraster entsteht. Wenn das dNTP komplementär zur auf den Sequenzierprimer folgenden Base des Einzelstranges ist, wird es in einer durch die DNA-Polymerase katalysierten Reaktion an den Sequenzierprimer, beziehungsweise im weiteren Verlauf an die vorhergegangenen Nukleotide, gehängt. Dabei wird Pyrophosphat (PPi) freigesetzt. Aus dem PPi wird zusammen mit Substrat APS durch die ATP-Sulfurylase ein ATP gebildet. Durch dieses ATP ist es dem Enzym Luciferase möglich, das Substrat Luciferin zu Oxyluciferin umzuwandeln. Hierbei entsteht sichtbares Licht. Die Menge des entstandenen sichtbaren Lichts ist proportional zur Menge des gebildeten ATP. Außerdem entsteht vermehrt sichtbares Licht, wenn mehrere gleiche Nukleotide hintereinander eingebaut werden. Das entstandene Licht wird von Sensoren des Pyrosequenzer erfasst und ist als ein Peak in der bildlichen Darstellung, dem Pyrogramm, abgebildet. Anschließend zersetzt das Enzym Apyrase nicht verwendete Nukleotide sowie das restliche ATP. Erst wenn dies erfolgt ist, wird das nächste dNTP injiziert und es wiederholt sich der zuvor beschriebene Vorgang. Eine schematische Darstellung findet sich in Abb. 8.



**Abb. 8: Schematische Darstellung der Pyrosequenzierung:** 1. Binden des Sequenzierprimers an die Einzelstrang-DNA. 2. Einbau eines passenden dNTPs durch die Polymerase unter Freisetzung von PPi. 3. Bildung eines ATP aus APS und PPi durch die Sulfurylase. Umwandlung von Luciferin in Oxyluciferin unter ATP-Verbrauch mit Freisetzung von sichtbarem Licht durch die Luciferase. 4. Zersetzung von nicht verwendeten dNTP und ATP durch die Apyrase. Quelle: Eigene Darstellung, basierend auf Informationsmaterial von Qiagen.

### 3.8.3.2 Durchführung

Die Durchführung erfolgte nach einer standardisierten Methodik des Labors für Hämatologie und Onkologie des Universitätsklinikum Marburg. Im ersten Schritt wurde der Streptavidin-Mix, wie in Tab. 15 aufgeführt, pipettiert.

Tab. 15: Pipettierschema für den Streptavidin-Mix.

Substrat	Menge 1x	Menge 24x
<b>Streptavidin Sepharose High Perfomence (beads)</b>	2µl	48µl
<b>Pyro Mark Binding-Buffer</b>	40µl	960µl
<b>RNase freies Wasser</b>	28µl	672µl
<b>Total</b>	<b>70µl</b>	<b>1680µl</b>

In 22 Vertiefungen einer 24-Well-Platte wurden je 70µl Streptavidin-Mix und je 10µl PCR-Produkt pipettiert. In die restlichen zwei Vertiefungen wurden ebenfalls 70µl Streptavidin-Mix pipettiert und die Positivkontrolle bzw. die Negativkontrolle (Wasser) zugefügt. Zelllinien, die als Positivkontrolle dienten, wurden bereits in Tab. 9 des Abschnitts Material und Methoden aufgeführt.

Es folgte eine Inkubation für 20 Minuten bei 23°C und 1400rpm im Schüttler. Währenddessen wurde der Sequenzier-Mix nach dem Schema der Tab. 16 mit den jeweiligen Sequenzierprimern erstellt und in die Vertiefungen einer 24-Well-Platte pipettiert.

Tab. 16: Pipettierschema des Sequenzier-Mix.

Substrat	Menge 1x	Menge 24x
Sequenzierprimer	4µl	96µl
Pyro Mark Annealing-Buffer	21µl	504µl
<b>Total</b>	<b>70µl</b>	<b>1680µl</b>

Für das Exon 9 wurden zur Detektion möglicher Mutationen jeweils drei verschiedene Sequenzierprimer verwendet. Die Sequenzierprimer sind der Tab. 8 zu entnehmen. Das Gemisch, bestehend aus PCR-Produkt und Streptavidin-Mix, wurde nach der Inkubation im Schüttler mit Hilfe einer Vakuumpumpe aufgesaugt und es erfolgten die einzelnen Waschschrte in der Waschstationen von der Firma Qiagen. Die Waschschrte sind Tab. 17 zu entnehmen.

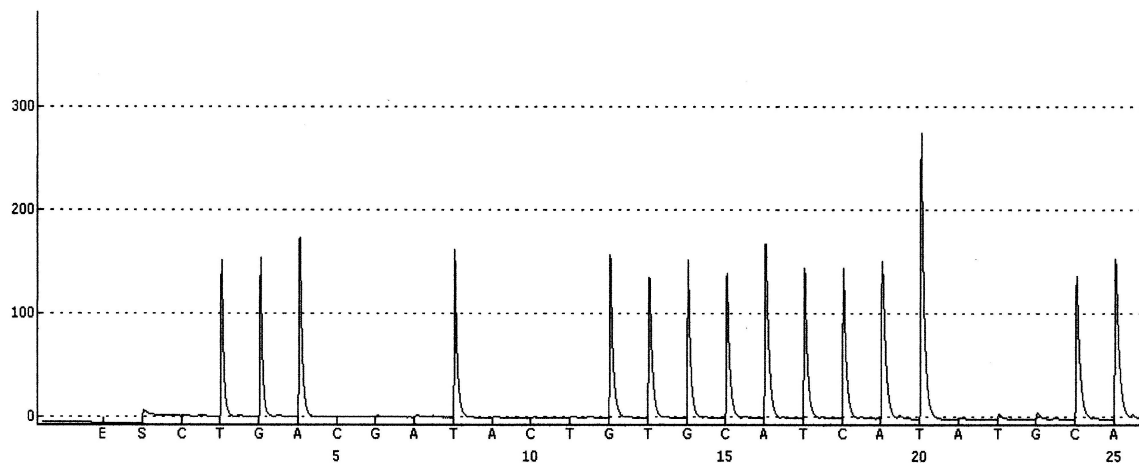
**Tab. 17: Waschschritte Waschstation Qiagen.**

<b>Lösung</b>	<b>Dauer</b>
Ethanol 70%	5 Sekunden
Denaturation Solution	5 Sekunden
Washing Buffer	10 Sekunden

Nachfolgend wurden die Proben durch Ausstellen des Sogs in die 24-Well-Platte des zuvor pipettierten Sequenzier-Mix gegeben. Anschließend wurden die Proben zwei Minuten bei 80°C im Heizblock inkubiert, um die Denaturierung der DNA und somit die Analyse des Einzelstranges zu ermöglichen. Nach fünfminütiger Abkühlung bei Raumtemperatur wurde die Platte mit den Proben in den Pyrosequenzer (PyroMark® Q24, Qiagen) gelegt. Zudem wurde in den Pyrosequenzer die Kartusche mit den Enzymen DNA-Polymerase, ATP Sulfurylase, Luciferase, Apyrase und den Substraten Adensoin-5'-phosphosulfat und Luciferin sowie den Desoxyribonukleotid-Triphosphate eingelegt. Das Programm der Firma Qiagen berechnete hierfür die jeweils zu pipettierenden Mengen, welche abhängig von der zu analysierenden Gensequenz und der Probenanzahl sind. Es erfolgte die Auswahl des entsprechenden Softwareprogramms von Qiagen und die Durchführung der Pyrosequenzierung. Die Ergebnisse wurden auf einem USB-Stick gespeichert und konnten anschließend auf den PC übertragen werden. Anhand der Pyrogramme konnten Mutationen detektiert werden.

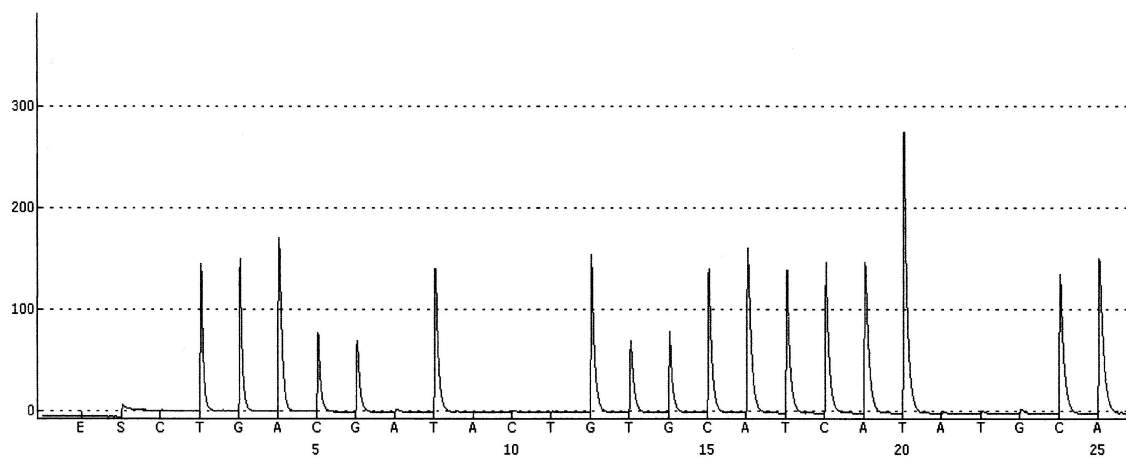
### 3.8.3.3 Auswertung

Das von den Sensoren des Pyrosequenzer erfasste Licht wird als ein Peak in der bildlichen Darstellung, dem Pyrogramm, über der entsprechenden Base abgebildet. So kann die genaue Gensequenz anhand des Pyrogramms abgelesen werden. Dies soll bildlich am Exon 20 des PIK3CA-Gen veranschaulicht werden. Das Pyrogramm in Abb. 9 zeigt den Wildtyp im Exon 20 des PIK3CA-Gens.



**Abb. 9: Pyrogramm: Wildtyp im Exon 20 des PIK3CA-Gen.** A=Adenin, T=Thymin, C=Cytosin, G=Guanin.

Das Exon 20 des PIK3CA-Gens zeigt im Pyrogramm im Wildtyp die Basenfolge TGATGTGCATCATTCA. Die Buchstaben stellen eine Abkürzung für den Basennamen dar. Das A steht für Adenin, das T für Thymin, das C für Cytosin und das G für Guanin. Wenn die Mutation c.3140A>G im Exon 20 des PIK3CA-Gens vorliegt, entspricht das Pyrogramm der Abb. 10.



**Abb. 10: Pyrogramm: c.3140A>G Mutation im Exon 20 des PIK3CA-Gen.** A=Adenin, T=Thymin, C=Cytosin, G=Guanin.

Bei dieser Mutation ist Adenin auf Position 3140 durch Guanin ersetzt worden. Dies führt zu neu entstandenen Lichtreaktionen und damit zu zusätzlichen Peaks. A>G beschreibt den Austausch der Base. Als erstes wird die ursprüngliche Base, welche beim Wildtyp vorliegt, genannt (Adenin). Als zweites wird die Base genannt, die in der Mutation die entsprechende Base ersetzt, genannt (Guanin). Die Zahl 3140 beschreibt

die genaue Stelle der Mutation auf der DNA. Das Exon 20 des PIK3CA-Gens zeigt bei c.3140A>G Mutation im Pyrogramm die Basenfolge TGACGTGCATCATTCA.

### 3.8.4 KRAS Multiplex-Sequenzierung

Mutationen im KRAS-Gen wurden mithilfe der Multiplex-Sequenzierung im Labor für Hämatologie und Onkologie des Universitätsklinikum Marburg ermittelt. Die Sequenzierung erfolgte durch Frau Stabla und Frau Dr. Nist in der Core Facility von Herrn Prof. Stiewe. Der KRAS-Locus, der dem Codon 4 bis 16 entspricht, wurde aus der durch Mikrodisektion isolierten DNA amplifiziert. Jede Patientenprobe wurde mit einer einzigartigen 8-Nukleotid-Barcode-Kombination unter Verwendung von zwölf verschiedenen Vorwärts-(5'-AAT [Barcode] TTATAAGGCCTGCTGAAAATGAC TGAA-3') und acht verschiedenen Rückwärts-(5'-AAT [Barcode] TGAATTAGCTGTA TCGTCAAGGCACT-3')-Primern pro 96-Well-Platte markiert. Die PCR-Produkte aus einer einzelnen 96-Well-Platte wurden gepoolt und gereinigt. Es wurde eine Sequenzierungsbibliothek unter Verwendung des IonXpress Plus Fragment Library Prep Kit (Life Technologies) in Kombination mit dem IonXpress Barcode Adapters 1-16 Kit (Life Technologies) hergestellt. Die Qualität der Sequenzierungsbibliotheken wurde mit einem Bioanalyzer DNA High Sensitivity Chip (Agilent) überprüft. Anschließend wurden die Bibliotheken durch qPCR gepoolt und quantifiziert. Die Sequenzierung wurde am IonTorrent PGM (Life Technologies) gemäß den Empfehlungen des Herstellers durchgeführt. Nach dem Demultiplexen und Entfernen der Tag-Sequenzen mit Cutadapt v1.7 wurden die Lesevorgänge mit Bowtie 2 (Version 2.0.0-beta7) an Ensembl v70 angepasst. Varianten im KRAS-Codierungsbereich wurden mit VarScan 2 (Version 2.3.5) mit einer minimalen Variantenfrequenz von 2,5% und einer minimalen Leseabdeckung von 2000 ermittelt.

## 3.9 Statistische Auswertung

Für die numerischen Ergebnisse wurden die Mittelwerte und Standardabweichungen (SD) berechnet. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p \leq 0,05$  wurde für alle statistischen Tests als signifikant angesehen. Ein statistischer Trend wurde bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p \leq 0,10$  angenommen.

Die Überlebenskurven wurden mit Hilfe der Kaplan-Meier Methode dargestellt und die dabei ermittelte Signifikanz mit Hilfe des Log-rank-Tests validiert. Alle Patienten, die

10 Jahre nach Erstdiagnose nicht verstorben waren, wurden rechtszensiert. Der Log-rank-Test wurde mit der Prism Software Version 6.0 (GraphPad Software, Inc.) kalkuliert. Der exakte Test von Fisher wurde ebenfalls mit Hilfe der Prism Software Version 6.0 (GraphPad Software, Inc.) kalkuliert. Zudem wurde die Hazard Ratio (HR) berechnet.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Charakteristika des gesamten Patientenkollektivs

#### **4.1.1 Alters- und Geschlechterverteilung**

Die Patienten (n=153) dieser Arbeit wurden anhand des Datums der operativen Entfernung eines KRK von Januar 2003 bis Dezember 2004 retrospektiv ermittelt. Das Follow-up betrug 120 Monate. 63 Patienten waren weiblichen (41%) und 90 Patienten männlichen (59%) Geschlechts. Zum Zeitpunkt der Diagnose war der jüngste Patient 36 Jahre alt und der älteste Patient 92 Jahre alt. Der Mittelwert für das Alter aller Patienten zum Diagnosezeitpunkt lag bei 69,9 Jahren (SD  $\pm 7,7$ ). Die Altersverteilung des gesamten Patientenkollektivs zum Diagnosezeitpunkt des KRK ist Abb. 11 zu entnehmen.

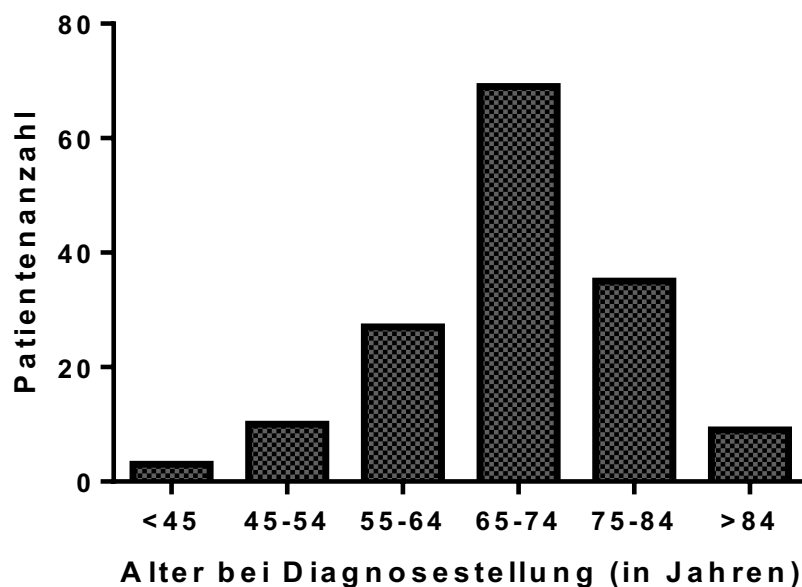


Abb. 11: Altersverteilung des gesamten Patientenkollektivs zum Diagnosezeitpunkt des KRK.

#### **4.1.2 Tumorlokalisation**

Die Tumorlokalisation wurde den Operationsberichten entnommen. Die Auswertung der Lokalisation der Tumore ergab, dass die meisten Tumore mit n=68 im distalen Colon (Colon descendens) lokalisiert waren. Bei 46 Patienten war der Primärtumor im Rektum



lokalisiert und bei 39 Patienten im proximalen Colon (Colon transversum und Colon ascendens). Die prozentuale Verteilung der Tumorlokalisationen ist Tab. 18 zu entnehmen.

**Tab. 18: Prozentuale Verteilung der Tumorlokalisationen des gesamten Patientenkollektivs.** Proximales Colon: Colon ascendens+Colon transversum, Distales Colon: Colon descendens+Colon sigmoideum.

<i>Tumorlokalisation</i>	<i>Patientenanzahl</i>	<i>Prozent (%)</i>
<i>Proximales Colon</i>	39	26
<i>Distales Colon</i>	68	44
<i>Rektum</i>	46	30

#### 4.1.3 Tumordifferenzierung und UICC-Stadium

Die für die Stadieneinteilung nach UICC und für das Grading notwendigen Angaben wurden dem histopathologischen Befund und den Arztbriefen entnommen. Die untersuchten Gewebeproben bestanden aus Primärtumoren (n=153). Die Mehrzahl der Tumore wies einen mäßigen Differenzierungsgrad (G2) auf (n=133). Ein gut differenziertes Karzinom (G1) fand sich bei 3% (n=5) der Patienten und einen hohen Malignitätsgrad (G3) zeigte der Tumor von 10% (n=15) der Patienten. Die meisten Patienten hatten ein lokal begrenztes UICC-Stadium I-III und wenige Patienten hatten ein UICC-Stadium IV mit ein bis zwei operablen Lebermetastasen. Tab. 19 zeigt die Verteilung der UICC-Stadien.

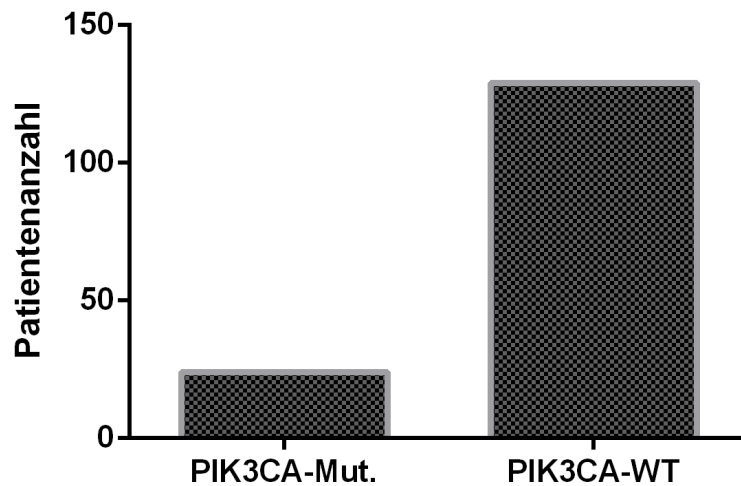
**Tab. 19: Verteilung der UICC-Stadien des gesamten Patientenkollektivs.**

<i>UICC-Stadium</i>	<i>Patientenanzahl</i>	<i>Prozent (%)</i>
<i>I</i>	39	26
<i>II</i>	53	35
<i>III</i>	56	37
<i>IV</i>	5	3

#### 4.1.4 Mutationsstatus im KRAS- und PIK3CA-Gen

Es erfolgte die Mutationsanalyse von Exon 9 und Exon 20 des PIK3CA-Gens. Wie in Abb. 12 grafisch dargestellt, wiesen die Tumorzellen von 24 Patienten (16%)

Punktmutationen in Exon 9 oder Exon 20 des PIK3CA-Gens auf, wohingegen die Tumorzellen von 129 Patienten (84%) in den untersuchten Genabschnitten dem PIK3CA-WT-Gen entsprachen. Damit lag in dem Gesamtkollektiv dieser Arbeit eine Mutationsfrequenz von 16% vor.



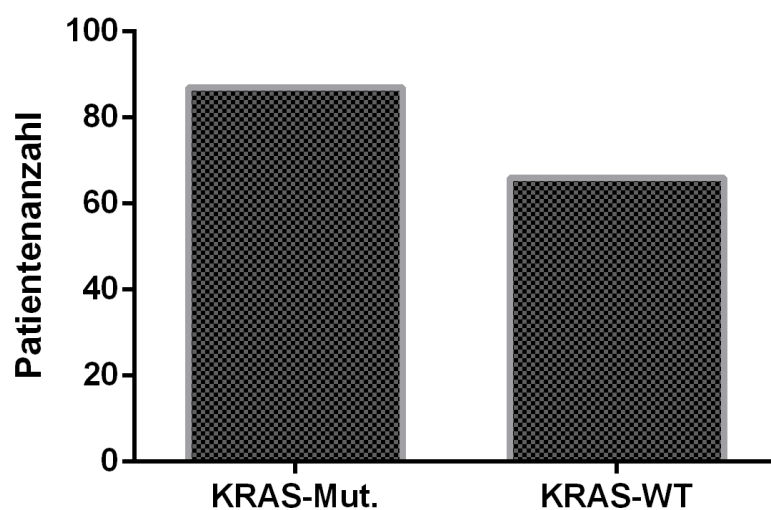
**Abb. 12: PIK3CA-Mutationsstatus des Gesamtkollektivs.**

Unter alle Mutationen im PIK3CA-Gen fanden sich 6 Mutationen im Exon 20 und 18 Mutationen im Exon 9. Doppelmutationen (Exon 9 und Exon 20) lagen nicht vor. Die häufigste Mutation war die c.1633G>A Mutation im Exon 9 gefolgt von der c.1624G>A Mutation im Exon 9 und der c.3140A>G Mutation im Exon 20. Die Patientenanzahl und der prozentuale Anteil der verschiedenen Mutationen sind Tab. 20 zu entnehmen.

**Tab. 20: Prozentualer Anteil der verschiedenen PIK3CA-Mutationen.** A=Adenin, C=Cytosin, G=Guanin.

<i>Mutation</i>	<i>Patientenanzahl</i>	<i>Prozent (%)</i>
<i>c.1634A&gt;G (Exon 9)</i>	1	4
<i>c.1636C&gt;A (Exon 9)</i>	2	8
<i>c.1633G&gt;A (Exon 9)</i>	8	33
<i>c.1624G&gt;A (Exon 9)</i>	7	29
<i>c.3140A&gt;G (Exon 20)</i>	6	25

Wie in Abb. 13 grafisch dargestellt, wiesen die Tumorzellen von 87 Patienten (57%) eine Mutation im Codon 12 oder 13 des KRAS-Gens auf und 66 Patienten (43%) zeigten den WT.



**Abb. 13: KRAS-Mutationsstatus des Gesamtkollektivs.**

Der prozentuale Anteil der verschiedenen Punktmutationen im Codon 12 und Codon 13 des KRAS-Gens ist Tab. 21 zu entnehmen.

**Tab. 21: Prozentualer Anteil der verschiedenen KRAS-Mutationen.** G=Glycin, D=Aspartat, V=Valin, S=Serin, C=Cystein, A=Alanin.

<i>Punktmutation</i>	<i>Patientenanzahl</i>	<i>Prozent (%)</i>
<i>G13D</i>	27	31
<i>G12D</i>	26	30
<i>G12V</i>	17	20
<i>G12S</i>	7	8
<i>G12C</i>	4	5
<i>G13S</i>	2	2
<i>G12A</i>	2	2
<i>G13C</i>	1	1
<i>G21D</i>	1	1

Die häufigste Mutation war die Glycin/Aspartat-Substitution im Codon 13 (p.G13D, 31%) gefolgt von der Glycin/Aspartat-Substitution im Codon 12 (p.G12D, 26%). Weitere 20% der Patienten wiesen eine Glycin/Valin-Substitution im Codon 12 (p.G12V, 20%) auf.

#### 4.1.5 ASS-Einnahmestatus

Mit Hilfe von Patientenakten und durch Kontaktaufnahme zu den Hausärzten der Patienten wurde, wie in Abb. 14 grafisch dargestellt, ermittelt, dass 52 Patienten in den ersten 10 Jahren nach Diagnosestellung regelmäßig ASS eingenommen hatten und 101 Patienten in den ersten 10 Jahren nach Diagnosestellung nicht regelmäßig ASS eingenommen hatten.

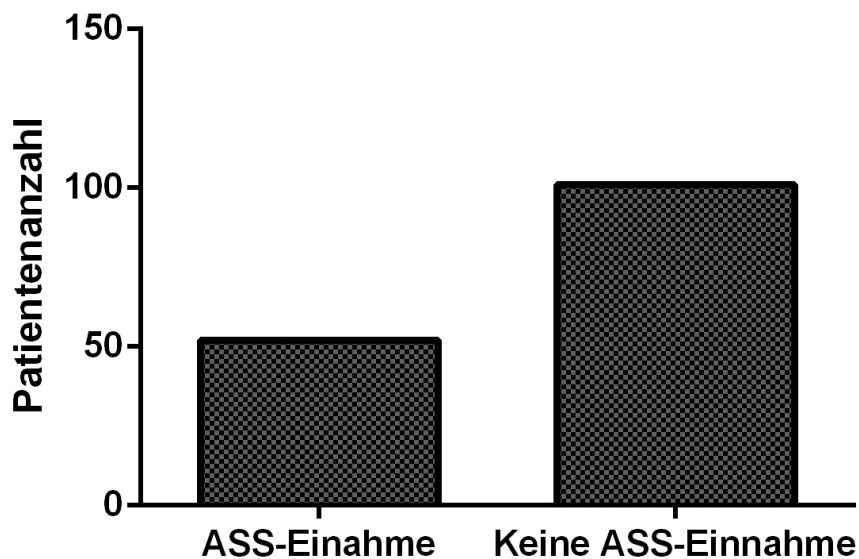


Abb. 14: ASS-Einnahmestatus des Gesamtkollektivs.

Demnach lag der prozentuale Anteil der Patienten mit regelmäßiger ASS-Einnahme in diesem Patientenkollektiv bei 34%. Die Kriterien einer regelmäßigen ASS-Einnahme wurden bereits in Kapitel 3.7.2.3 erläutert.

#### 4.1.6 Absolute 10-Jahres-Überlebensrate

Mit Hilfe der Patientenakten, der Hausärzte und des jeweils zuständigen Melderegisters konnte ermittelt werden, dass im für diese Arbeit relevanten Zeitraum von 10 Jahren nach der operativen Entfernung des KRK 86 Patienten verstorben waren. Die Todesursache wurde nicht berücksichtigt. 67 der Patienten waren 10 Jahre nach operativer Entfernung des KRK noch am Leben. Die absolute 10-Jahres-Überlebensrate aller Patienten betrug 44% und ist der Kaplan-Meier-Kurve in Abb. 15 zu entnehmen.

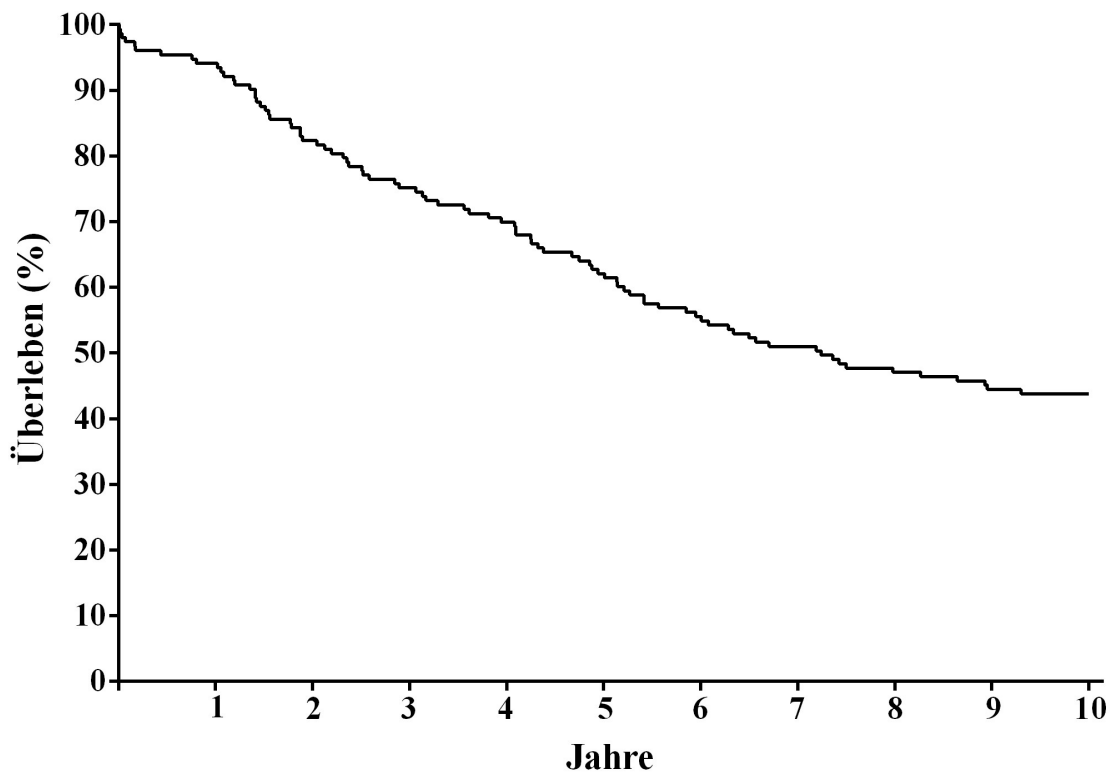


Abb. 15: Kaplan-Meier-Kurve, Gesamtkollektiv (153 Patienten, UICC I-III, UICC IV mit resektablen Lebermetastasen), absolute Überlebensrate nach Diagnosestellung des KRK.

Da das Endereignis am Stichtag der Auswertung (10 Jahre nach Erstdiagnose) nicht bei allen Patienten eingetreten war, handelt es sich hierbei und auch im Folgenden um rechtszensierte Überlebenszeiten.

## **4.2 Charakteristika des Patientenkollektivs in**

### **Bezug auf den PIK3CA-Mutationsstatus**

Demografische, klinische und pathologische Charakteristika der 153 Patienten mit KRK in Bezug auf den PIK3CA-Mutationsstatus und den ASS-Einnahmestatus sind Tab. 22 zu entnehmen.

**Tab. 22: Demografische, klinische und pathologische Charakteristika der 153 Patienten mit KRK in Bezug auf den PIK3CA-Mutationsstatus und den ASS-Einnahmestatus.** Proximales Colon: Colon ascendens+Colon transversum, Distales Colon: Colon descendens+Colon sigmoideum.

Charakteristika	Alle Patienten (n=153)	PIK3CA-WT		PIK3CA-Mut.	
		Keine ASS-Einnahme	ASS-Einnahme	Keine ASS-Einnahme	ASS-Einnahme
Geschlecht					
Männlich	90 (59%)	46 (54%)	26 (59%)	11 (69%)	7 (88%)
Weiblich	63 (41%)	39 (46%)	18 (41%)	5 (31%)	1 (12%)
Alter	69,9±7,7	68,8±11,6	71,6±7,6	69,4±9,0	72,4±5,0
Jahr der Diagnose					
2003	72 (47%)	36 (42%)	23 (52%)	7 (44%)	6 (75%)
2004	81 (53%)	49 (58%)	21 (48%)	9 (56%)	2 (35%)
Tumorlokalisation					
Rektum	46 (30%)	25 (29%)	17 (39%)	3 (19%)	1 (13%)
Dist. Colon	68 (44%)	42 (49%)	15 (34%)	6 (38%)	5 (63%)
Prox. Colon	39 (25%)	18 (21%)	12 (27%)	7 (44%)	2 (25%)
Krankheitsstadium					
I	39 (25%)	22 (26%)	10 (23%)	4 (25%)	3 (37%)
II	53 (35%)	31 (36%)	16 (36%)	5 (31%)	1 (13%)
III	56 (37%)	29 (34%)	16 (36%)	7 (44%)	4 (50%)
IV	5 (3%)	3 (4%)	2 (5%)	0 (0%)	0 (0%)
Tumorgrading					
G1	5 (3%)	2 (2%)	1 (2%)	0 (0%)	2 (25%)
G2	133 (87%)	73 (86%)	41 (93%)	15 (94%)	4 (50%)
G3	15 (10%)	10 (12%)	2 (5%)	1 (6%)	2 (25%)
KRAS					
Wildtyp	66 (43%)	41 (48%)	14 (32%)	8 (50%)	3 (38%)
Mutation	87 (57%)	44 (52%)	30 (68%)	8 (50%)	5 (62%)

### 4.2.1 Vergleich der Patientenkollektive mit Primärtumoren mit PIK3CA-WT und PIK3CA-Mut.

Wie bereits in Kapitel 4.1.4 aufgeführt, war die Anzahl der Patienten mit einer Tumormutation im PIK3CA-Gen mit 24 Patienten (16%) deutlich geringer als die Anzahl der Patienten mit Tumoren mit PIK3CA-WT-Gen ( $n=129$ ). Dieses entsprach der zu erwartenden Mutationsfrequenz.

Der prozentuale Anteil der Männer war unter den Patienten mit PIK3CA-Tumormutation mit 72% höher als der Anteil der Männer unter den Patienten mit Tumoren mit PIK3CA-WT (56%). Dies war allerdings statistisch nicht signifikant (Exakter Fisher-Test,  $p=0,11$ ).

Das mittlere Alter der Patienten mit Tumoren mit PIK3CA-WT betrug  $69,8 \pm 10,5$  Jahre und das mittlere Alter der Patienten mit Tumormutation im PIK3CA-Gen betrug  $70,4 \pm 8,2$  Jahre (t-Test,  $p=0,79$ ). Der Vergleich der Altersverteilung beider Kohorten ist Abb. 16 zu entnehmen.

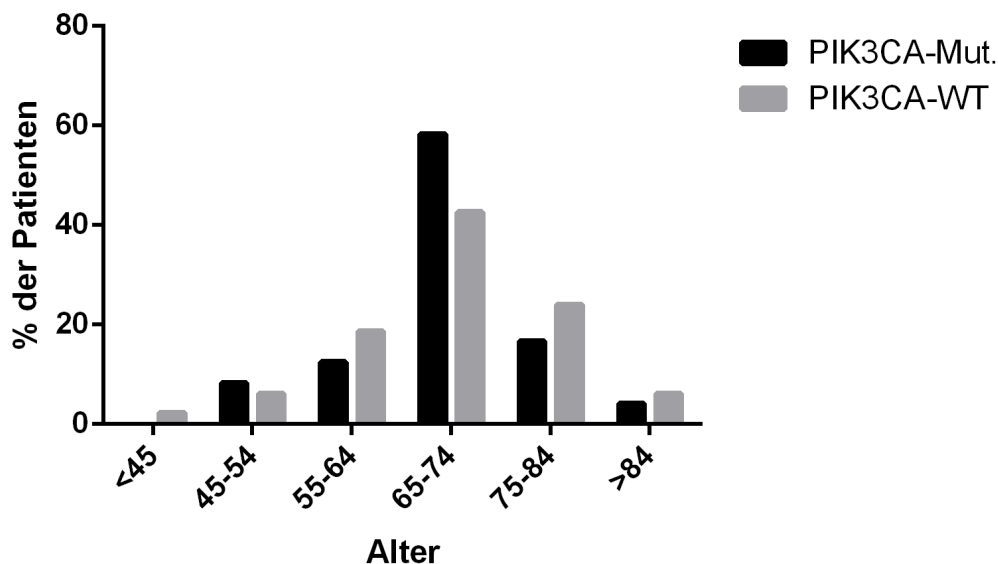


Abb. 16: Altersverteilung der Gruppen PIK3CA-Mut. und PIK3CA-WT.

Unter den Patienten mit rechtsseitigem KRK wiesen 8 der 39 Patienten eine Mutation im PIK3CA-Gen auf (21%) und unter den Patienten mit linksseitigem KRK wiesen 16 der 114 Patienten eine Mutation im PIK3CA-Gen auf (14%). Dieser Unterschied war

statistisch nicht signifikant. Auch in Bezug auf Krankheitsstadium und Tumorgrading zeigten sich in beiden Gruppen keine signifikanten Unterschiede.

Tumormutationen im KRAS-Gen waren gleichmäßig verteilt auf Patienten mit PIK3CA-WT-Tumoren und Patienten mit mutierten PIK3CA-Tumoren: Eine zusätzliche KRAS-Mutation fand sich bei 13/24 (54%) der mutierten PIK3CA-Tumoren und bei 74/129 (57%) der PIK3CA-WT-Tumoren (Exakter Fisher-Test,  $p=0,82$ ).

34% der Patienten mit Tumoren mit PIK3CA-WT und 33% der Patienten mit einer Tumormutation im PIK3CA-Gen nahmen nach Diagnosestellung des KRK regelmäßig ASS ein.

Insgesamt zeigen somit die beiden Kollektive der Patienten mit Primärtumoren mit PIK3CA-WT und der Patienten mit Primärtumoren mit PIK3CA-Mut. im Hinblick auf die betrachteten Kriterien ein sehr homogenes Bild.

#### **4.2.2 Vergleich der Patientenkollektive mit und ohne regelmäßige ASS-Einnahme nach Diagnosestellung des KRK**

Das Patientenkollektiv der Patienten mit regelmäßiger ASS-Einnahme war mit 52 Patienten (34%) kleiner als das Patientenkollektiv der Patienten ohne regelmäßige ASS-Einnahme ( $n=101$ ).

30% der Frauen und 37% der Männer nahmen regelmäßig ASS ein (Exakter Fisher-Test,  $p=0,49$ ).

Das mittlere Alter der Patienten mit regelmäßiger ASS Einnahme betrug  $71,8 \pm 7,4$  Jahren und das mittlere Alter der Patienten ohne regelmäßige ASS-Einnahme betrug  $68,9 \pm 11,3$  Jahre. Damit war das Alter der Patienten mit regelmäßiger ASS-Einnahme nicht signifikant höher als das Alter der Patienten ohne regelmäßige ASS-Einnahme (t-Test,  $p=0,1$ ). Der Vergleich der Altersverteilungen beider Kohorten ist Abb. 17 zu entnehmen.



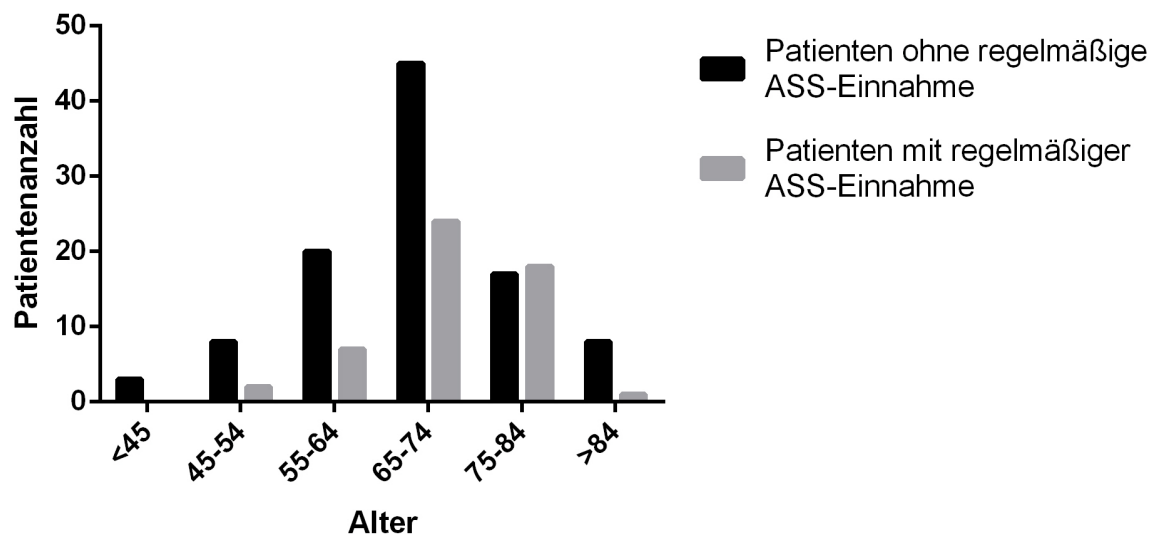


Abb. 17: Altersverteilung der Patienten mit und ohne regelmäßige ASS-Einnahme.

In Bezug auf Tumorlokalisation, Krankheitsstadium und Tumorgrading zeigte sich in beiden Gruppen kein signifikanter Unterschied.

Eine Mutation im KRAS-Gen fand sich bei 35/52 (67%) der Tumoren bei Patienten mit regelmäßiger ASS-Einnahme und bei 52/101 (51%) der Tumoren bei Patienten ohne regelmäßige ASS-Einnahme (Exakter Fisher-Test,  $p=0,08$ ).

Eine PIK3CA-Mut. des Tumors war gleichmäßig auf die Patientengruppen mit und ohne regelmäßige ASS-Einnahme verteilt. Sie fand sich bei 8/52 (15%) der Tumoren bei Patienten mit regelmäßiger ASS-Einnahme und bei 16/101 (16%) der Tumoren bei Patienten ohne regelmäßige ASS-Einnahme.

### **4.3 Charakteristika des Patientenkollektivs in Bezug auf den KRAS-Mutationsstatus**

Die Charakteristika des Patientenkollektivs in Bezug auf den KRAS-Mutationsstatus in Abhängigkeit vom ASS-Einnahmestatus sind Tab. 23 zu entnehmen.

**Tab. 23: Demografische, klinische und pathologische Charakteristika der 153 Patienten mit KRK in Bezug auf den KRAS-Mutationsstatus und den ASS-Einnahmestatus.** Proximales Colon: Colon ascendens+Colon transversum, Distales Colon: Colon descendens+Colon sigmoideum.

Charakteristika	Alle Patienten (n=153)	KRAS-WT		KRAS-Mut.	
		Keine ASS-Einnahme	ASS-Einnahme	Keine ASS-Einnahme	ASS-Einnahme
Geschlecht					
Männlich	90 (59%)	26 (53%)	10 (59%)	31 (60%)	23 (66%)
Weiblich	63 (41%)	23 (47%)	7 (41%)	21 (40%)	12 (34%)
Alter	69,9±7,7	71,2±7,8	72,1±6,0	66,7±9,1	71,6±5,9
Jahr der Diagnose					
2003	72 (47%)	16 (33%)	10 (59%)	29 (56%)	17 (49%)
2004	81 (53%)	33 (67%)	7 (41%)	23 (44%)	18 (51%)
Tumorlokalisation					
Rectum	46 (30%)	13 (27%)	5 (29%)	15 (29%)	13 (37%)
Dist. Colon	68 (44%)	22 (45%)	5 (29%)	26 (50%)	15 (43%)
Prox. Colon	39 (25%)	14 (29%)	7 (41%)	11 (21%)	7 (20%)
Krankheitsstadium					
I	39 (25%)	9 (18%)	4 (24%)	17 (33%)	9 (26%)
II	53 (35%)	21 (43%)	5 (29%)	16 (31%)	11 (31%)
III	56 (37%)	17 (35%)	8 (47%)	18 (35%)	13 (37%)
IV	5 (3%)	2 (4%)	0 (0%)	1 (2%)	2 (6%)
Tumorgrading					
G1	5 (3%)	1 (2%)	0 (0%)	1 (2%)	3 (9%)
G2	133 (87%)	41 (84%)	16 (94%)	47 (90%)	29 (83%)
G3	15 (10%)	7 (14%)	1 (6%)	4 (8%)	3 (9%)
PIK3CA					
Wildtyp	129 (84%)	41 (84%)	14 (82%)	44 (85%)	30 (86%)
Mutation	24 (16%)	8 (16%)	3 (18%)	8 (15%)	5 (14%)

### 4.3.1 Vergleich der Patientenkollektive mit Primärtumoren mit KRAS-WT und KRAS-Mut.

Das Patientenkollektiv der Patienten mit einer Mutation im KRAS-Gen des Tumors war mit 87 Patienten (57%) größer als das Patientenkollektiv der Patienten mit KRAS-WT-Tumoren (n=66).

Das mittlere Alter der Patienten mit KRAS-Mut. des Tumors betrug  $68,7 \pm 10,4$  Jahre und das mittlere Alter der Patienten mit Tumoren mit KRAS-WT betrug  $71,4 \pm 9,8$  Jahre (t-Test,  $p=0,09$ ). Der Vergleich der Altersverteilung beider Kohorten ist Abb. 18 zu entnehmen.

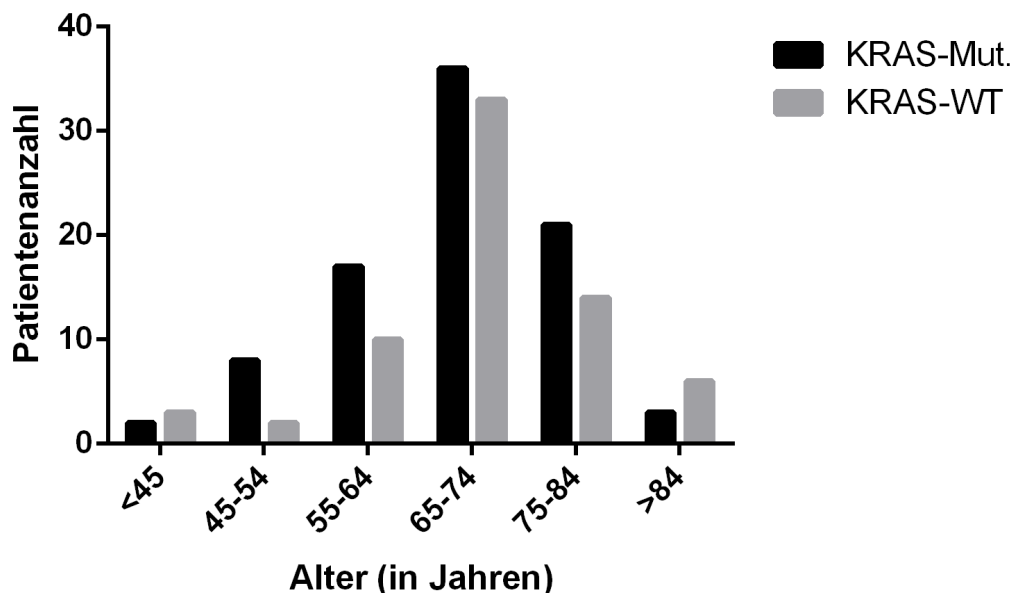


Abb. 18: Altersverteilung der Patienten mit KRAS-Mut. und KRAS-WT.

Im proximalen Colon wiesen 18/39 (46%) der Tumoren eine Mutation im KRAS-Gen auf. Im distalen Colon wiesen 41/68 (60%) der Tumoren eine KRAS-Mut. auf (Exakter Fisher-Test,  $p=0,16$ ). In Bezug auf Krankheitsstadium und Tumorgrading gab es keine signifikanten Unterschiede in beiden Gruppen.

Eine Mutation im PIK3CA-Gen fand sich bei 13/87 (15%) der Patienten mit KRAS-Mut. und bei 11/66 (17%) der Patienten mit KRAS-WT (Exakter Fisher-Test,  $p=0,82$ ).

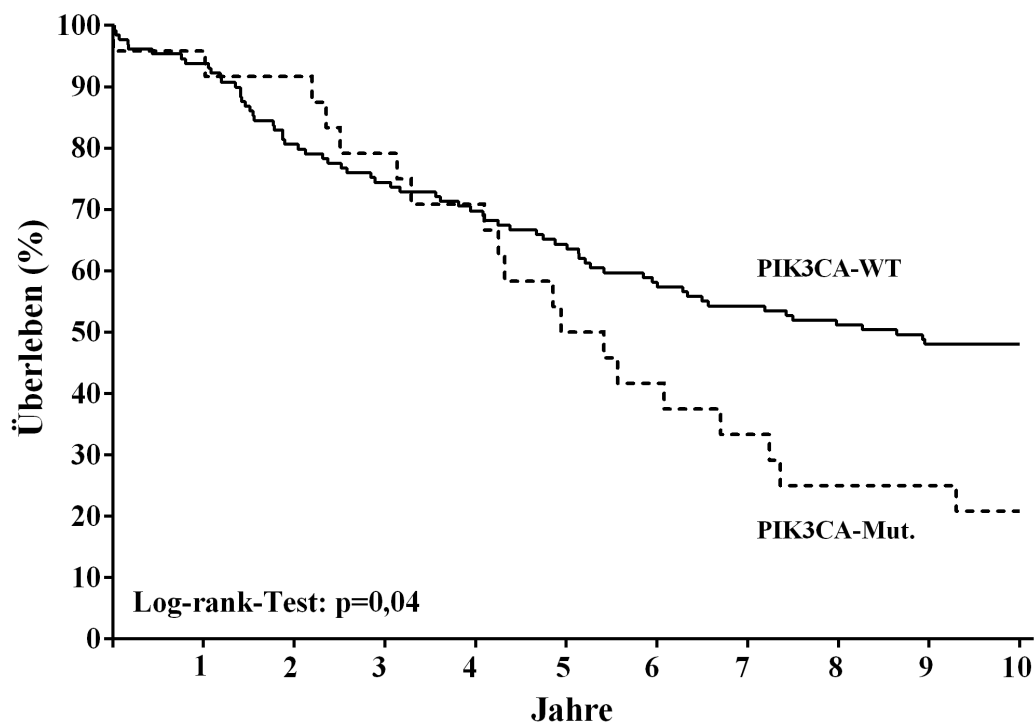
Auch in Bezug auf eine regelmäßige ASS-Einnahme fand sich in beiden Gruppen kein signifikanter Unterschied. Eine regelmäßige ASS-Einnahme fand bei 34/87 (39%) der

Patienten mit KRAS mutierten Tumoren und bei 17/66 (26%) der Patienten mit KRAS-WT-Tumoren statt (Exakter Fisher-Test:  $p=0,12$ ).

## 4.4 Mutationsstatus und Prognose

### 4.4.1 Korrelation von Mutationsstatus des PIK3CA-Gens und OS

In dieser retrospektiven Analyse betrug die absolute 10-Jahres-Überlebensrate von Patienten mit WT-PIK3CA-Tumoren 48%, wohingegen die absolute 10-Jahres-Überlebensrate von Patienten mit Tumoren mit mutiertem PIK3CA-Gen (Exon 9 oder Exon 20) bei 21% lag. Patienten mit PIK3CA-WT wiesen daher einen signifikanten Überlebensvorteil gegenüber Patienten mit PIK3CA-Mut. auf (Log-rank-Test:  $HR=0,59$ ; 95% KI=0,29-0,96;  $p=0,04$ ; Abb. 19).

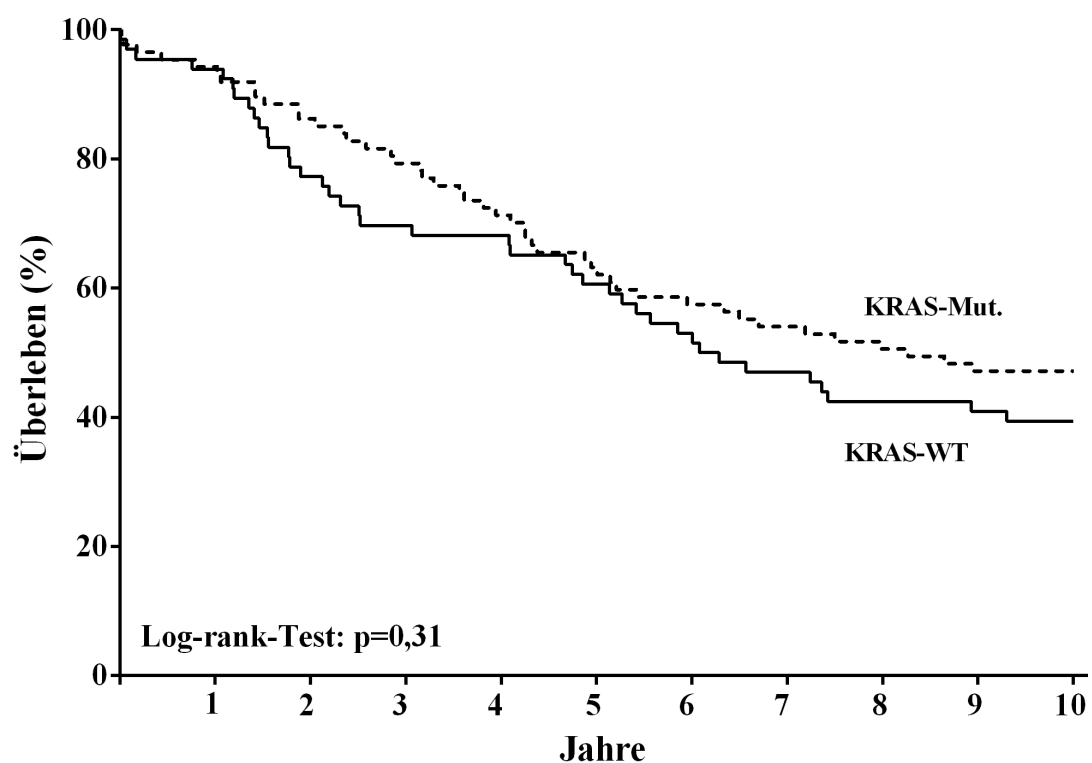


PIK3CA	Anzahl der Patienten	Innerhalb von 10 Jahren nach Diagnosestellung verstorben	Innerhalb von 10 Jahren nach Diagnosestellung nicht verstorben
WT	129	67 (52%)	62 (48%)
Mut.	24	19 (79%)	5 (21%)

Abb. 19: Kaplan-Meier-Kurve, Gesamtkollektiv, absolute Überlebensrate nach Diagnosestellung des KKR in Abhängigkeit vom PIK3CA-Mutationsstatus.

#### 4.4.2 Korrelation von Mutationsstatus des KRAS-Gens und OS

Die absolute 10-Jahres-Überlebensrate von Patienten mit KRAS-WT-Tumoren lag bei 39%, wohingegen die absolute 10-Jahres-Überlebensrate von Patienten mit Tumoren mit mutiertem KRAS-Gen bei 47% lag. Nach einem Beobachtungszeitraum von 10 Jahren zeigte sich demnach kein signifikanter Einfluss vom KRAS-Mutationsstatus auf das 10-Jahres-Gesamtüberleben in dieser Kohorte (Log-rank-Test: HR=0,8; 95% KI=0,52-1,23;  $p=0,31$ ; Abb. 20).

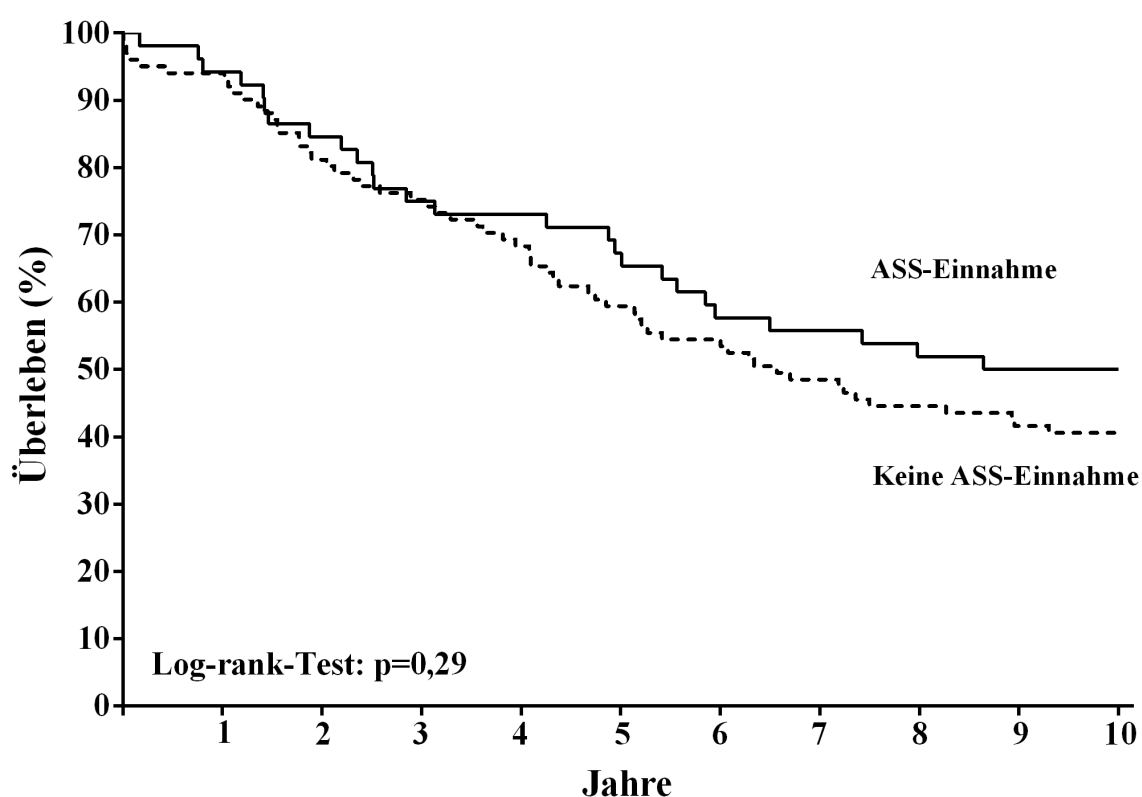


KRAS	Anzahl der Patienten	Innerhalb von 10 Jahren nach Diagnosestellung verstorben	Innerhalb von 10 Jahren nach Diagnosestellung nicht verstorben
WT	66	40 (61%)	26 (39%)
Mut.	87	46 (63%)	41 (47%)

Abb. 20: Kaplan-Meier-Kurve, Gesamtkollektiv, absolute Überlebensrate nach Diagnosestellung des KKR in Abhängigkeit vom KRAS-Mutationsstatus.

## 4.5 ASS-Einnahmestatus und Prognose

In dieser retrospektiven Analyse betrug bei Patienten mit regelmäßiger ASS-Einnahme die absolute 10-Jahres-Überlebensrate 50%. Bei Patienten ohne regelmäßige ASS-Einnahme betrug die absolute 10-Jahres-Überlebensrate 41%. Damit zeigten die Patienten mit regelmäßiger ASS-Einnahme keinen signifikanten Überlebensvorteil gegenüber Patienten ohne regelmäßige ASS-Einnahme (Log-rank-Test:  $HR=0,77$ ; 95%  $KI=0,5-1,22$ ;  $p=0,29$ ; Abb. 21).



ASS	Anzahl der Patienten	Innerhalb von 10 Jahre nach Diagnosestellung verstorben	Innerhalb von 10 Jahre nach Diagnosestellung nicht verstorben
Keine Einnahme	101	60 (59%)	41 (41%)
Einnahme	52	26 (50%)	26 (50%)

Abb. 21: Kaplan-Meier-Kurve, Gesamtkollektiv, absolute Überlebensrate nach Diagnosestellung des KRK in Abhängigkeit vom ASS-Einnahmestatus.

## **4.6 Korrelation von ASS-Einnahmestatus und OS in Abhängigkeit des Mutationsstatus der Gene KRAS und PIK3CA**

Da im Gesamtkollektiv der Patienten kein signifikanter Überlebensvorteil bei regelmäßiger ASS-Einnahme gezeigt wurde, war das Ziel herauszufinden, ob ein Überlebensvorteil bei Einnahme von ASS in Abhängigkeit vom Mutationsstatus der Gene KRAS und PIK3CA besteht.

Zunächst erfolgte die isolierte Betrachtung des PIK3CA- und KRAS-Mutationsstatus in Abhängigkeit vom ASS-Einnahmestatus und anschließend erfolgte die kombinierte Betrachtung des PIK3CA- und KRAS-Mutationsstatus in Abhängigkeit vom ASS-Einnahmestatus. Es erfolgte die Betrachtung folgender Subgruppen:

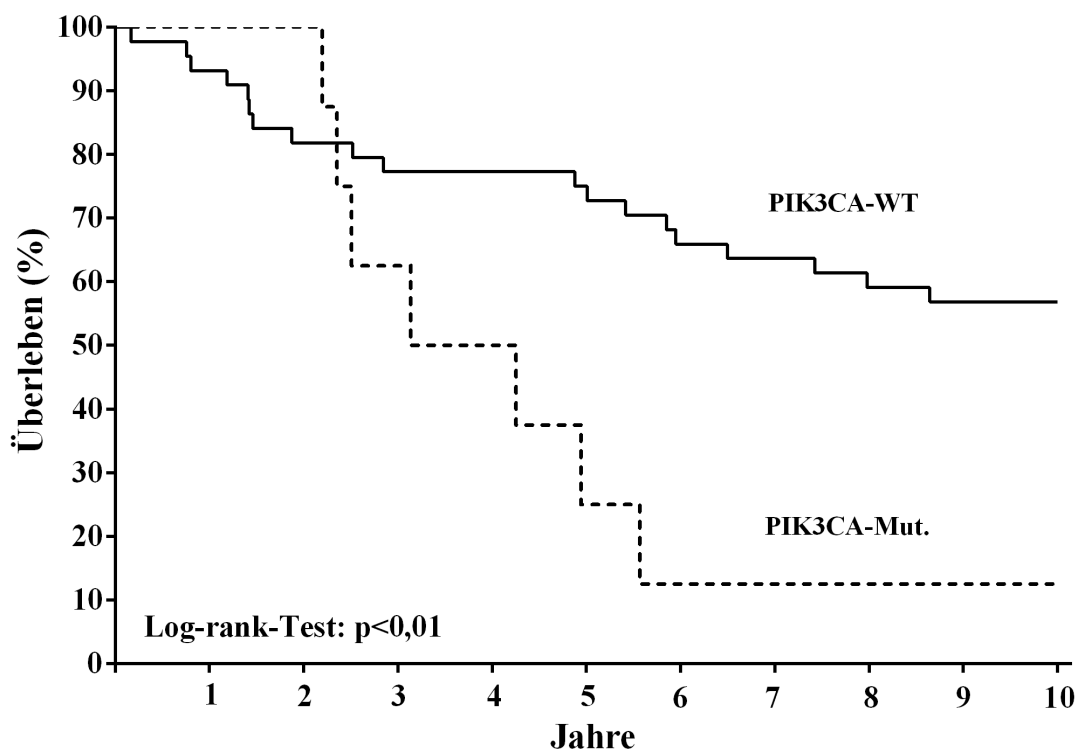
- Isolierte Betrachtung des PIK3CA-Mutationsstatus
  - Patienten mit regelmäßiger ASS-Einnahme
  - Patienten ohne regelmäßige ASS-Einnahme
- Isolierte Betrachtung des KRAS-Mutationsstatus
  - Patienten mit regelmäßiger ASS-Einnahme
  - Patienten ohne regelmäßige ASS-Einnahme
- Kombinierte Betrachtung des PIK3CA- und KRAS-Mutationsstatus
  - Patienten mit regelmäßiger ASS-Einnahme
  - Patienten ohne regelmäßige ASS-Einnahme
- Betrachtung von Patienten mit PIK3CA-WT und KRAS-Mut.

### **4.6.1 Isolierte Betrachtung des PIK3CA-Mutationsstatus**

Es erfolgte die isolierte Betrachtung des PIK3CA-Mutationsstatus in Abhängigkeit vom ASS-Einnahmestatus und unabhängig vom KRAS-Mutationsstatus.

#### 4.6.1.1 Patienten mit regelmäßiger ASS-Einnahme

Bei Betrachtung aller Patienten mit regelmäßiger ASS-Einnahme nach Diagnosestellung betrug die absolute 10-Jahres-Überlebensrate bei Patienten mit PIK3CA-Mut. 13% und bei Patienten mit PIK3CA-WT 57%. Damit zeigten unter allen Patienten mit regelmäßiger ASS-Einnahme Patienten mit PIK3CA-WT einen signifikanten Überlebensvorteil gegenüber Patienten mit PIK3CA-Mut. (Log-rank-Test: HR=0,33; 95% KI=0,05-0,62;  $p<0,01$ ; Abb. 22).



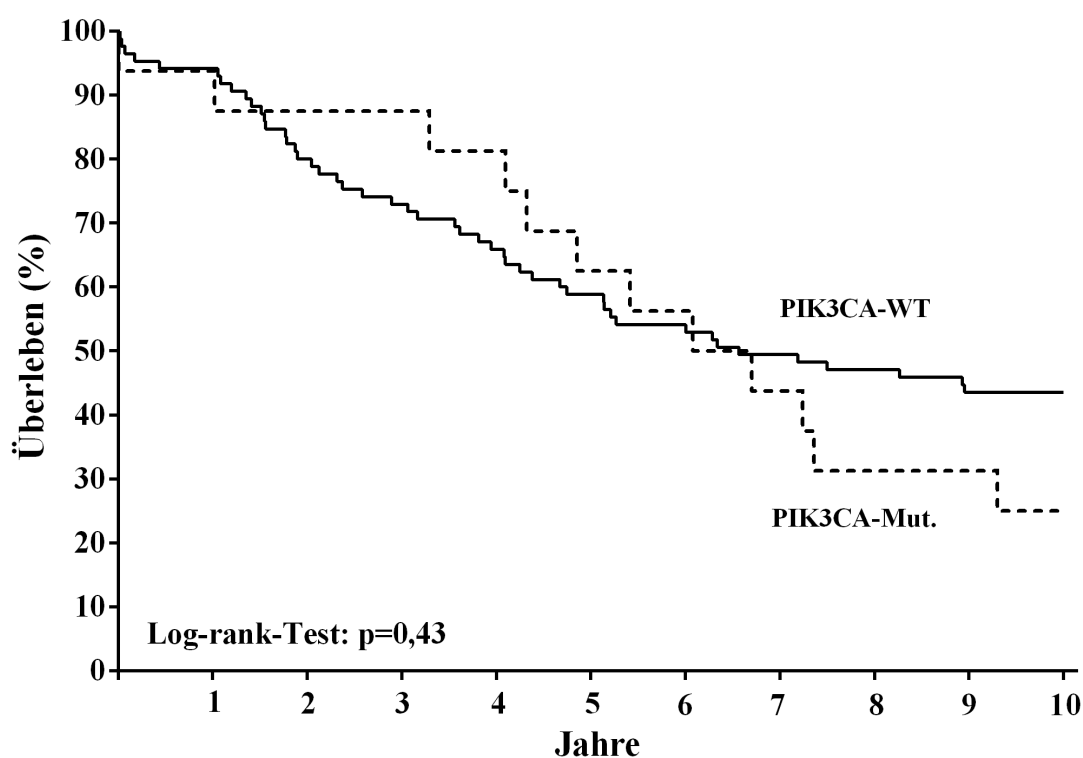
Patienten mit ASS-Einnahme	Anzahl der Patienten	Innerhalb von 10 Jahren nach Diagnosestellung verstorben	Innerhalb von 10 Jahren nach Diagnosestellung nicht verstorben
PIK3CA-WT	44	19 (43%)	25 (57%)
PIK3CA-Mut.	8	7 (88%)	1 (13%)

Abb. 22: Kaplan-Meier-Kurve, Patienten mit regelmäßiger ASS-Einnahme, absolute Überlebensrate nach Diagnosestellung des KHK in Abhängigkeit vom PIK3CA-Mutationsstatus.



#### 4.6.1.2 Patienten ohne regelmäßige ASS-Einnahme

Bei Betrachtung aller Patienten ohne regelmäßige ASS-Einnahme nach Diagnosestellung betrug die absolute 10-Jahres-Überlebensrate bei Patienten mit PIK3CA-WT 44% und bei Patienten mit PIK3CA-Mut. 25%. Im Gegensatz zu dem Ergebnis der Patienten mit regelmäßiger ASS-Einnahme zeigten unter allen Patienten ohne regelmäßige ASS-Einnahme die Patienten mit PIK3CA-WT keinen signifikanten Überlebensvorteil gegenüber Patienten mit PIK3CA-Mut. (Log-rank-Test: HR=0,78; 95% KI=0,38-1,51; p=0,43; Abb. 23).



Patienten ohne ASS-Einnahme	Anzahl der Patienten	Innerhalb von 10 Jahren nach Diagnosestellung verstorben	Innerhalb von 10 Jahren nach Diagnosestellung nicht verstorben
PIK3CA-WT	85	48 (56%)	37 (44%)
PIK3CA-Mut.	16	12 (75%)	4 (25%)

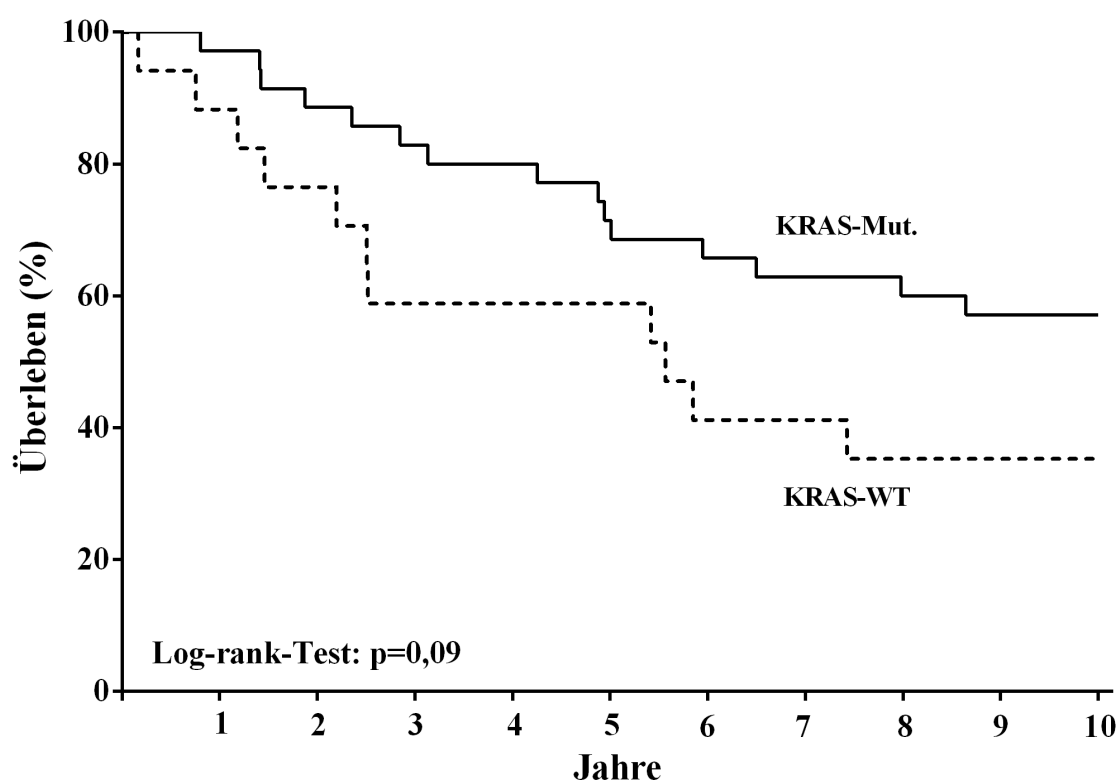
Abb. 23: Kaplan-Meier-Kurve, Patienten ohne regelmäßige ASS-Einnahme, absolute Überlebensrate nach Diagnosestellung des KHK in Abhängigkeit vom PIK3CA-Mutationsstatus.

### 4.6.2 Isolierte Betrachtung des KRAS-Mutationsstatus

Es erfolgte die isolierte Betrachtung des KRAS-Mutationsstatus in Abhängigkeit vom ASS-Einnahmestatus und unabhängig vom PIK3CA-Mutationsstatus.

#### 4.6.2.1 Patienten mit regelmäßiger ASS-Einnahme

Bei Patienten mit regelmäßiger ASS-Einnahme lag die absolute 10-Jahres-Überlebensrate bei Patienten mit Mutation im KRAS-Gen bei 57%, wohingegen die absolute 10-Jahres-Überlebensrate bei Patienten mit KRAS-WT bei 35% lag. Es zeigte sich im Log-rank-Test in der Gruppe der Patienten mit regelmäßiger ASS-Einnahme ein Trend für einen Überlebensvorteil der Patienten mit KRAS-Mut. gegenüber Patienten mit KRAS-WT (Log-rank-Test: HR=0,51; 95% KI=0,2-1,11; p=0,09; Abb. 24).

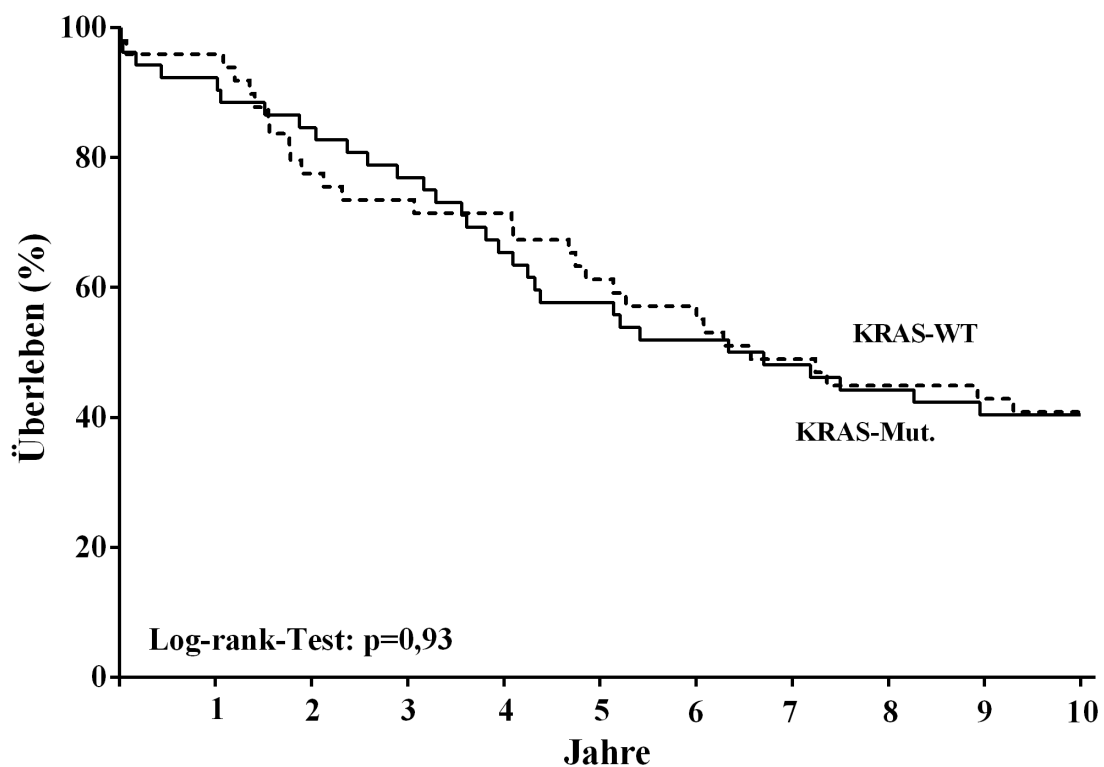


Patienten mit regelmäßiger ASS-Einnahme	Anzahl der Patienten	Innerhalb von 10 Jahren nach Diagnosestellung verstorben	Innerhalb von 10 Jahren nach Diagnosestellung nicht verstorben
KRAS-WT	17	11 (65%)	6 (35%)
KRAS-Mut.	35	15 (43%)	20 (57%)

Abb. 24: Kaplan-Meier-Kurve, Patienten mit regelmäßiger ASS-Einnahme, absolute Überlebensrate nach Diagnosestellung des KRK in Abhängigkeit vom KRAS-Mutationsstatus.

#### 4.6.2.2 Patienten ohne regelmäßige ASS-Einnahme

In der Gruppe der Patienten ohne regelmäßige ASS-Einnahme zeigte sich im Zeitrahmen von 10-Jahren kein signifikanter Unterschied im OS bei Patienten mit und ohne Mutation im KRAS-Gen des Tumors. Bei Patienten ohne regelmäßige ASS-Einnahme lag die 10-Jahres-Überlebensrate unabhängig vom KRAS-Mutationsstatus bei ungefähr 40% (Log-rank-Test: HR=1,02; 95% KI=0,61-1,7; p=0,93; Abb. 25).



Patienten ohne regelmäßige ASS-Einnahme	Anzahl der Patienten	Innerhalb von 10 Jahren nach Diagnosestellung verstorben	Innerhalb von 10 Jahren nach Diagnosestellung nicht verstorben
KRAS-WT	49	29 (59%)	20 (41%)
KRAS-Mut.	52	31 (60%)	21 (40%)

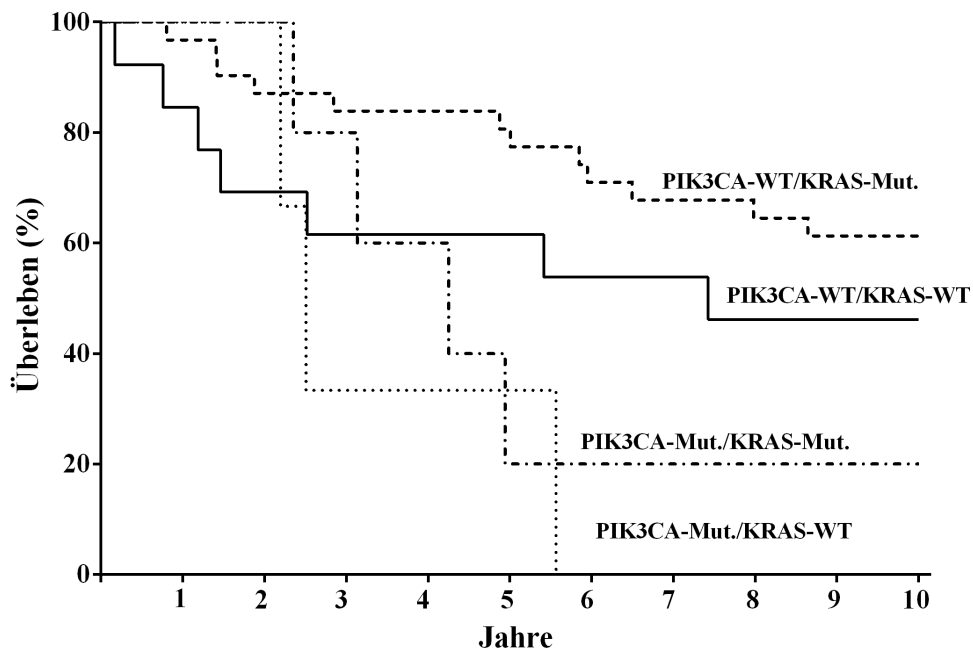
Abb. 25: Kaplan-Meier-Kurve, Patienten ohne regelmäßige ASS-Einnahme, absolute Überlebensrate nach Diagnosestellung des KKR in Abhängigkeit vom KRAS-Mutationsstatus.

#### 4.6.3 Kombinierte Betrachtung des KRAS- und PIK3CA-Mutationsstatus

Es erfolgte zudem die kombinierte Betrachtung des KRAS- und PIK3CA-Mutationsstatus in Abhängigkeit vom ASS-Einnahmestatus.

#### 4.6.3.1 Patienten mit regelmäßiger ASS-Einnahme

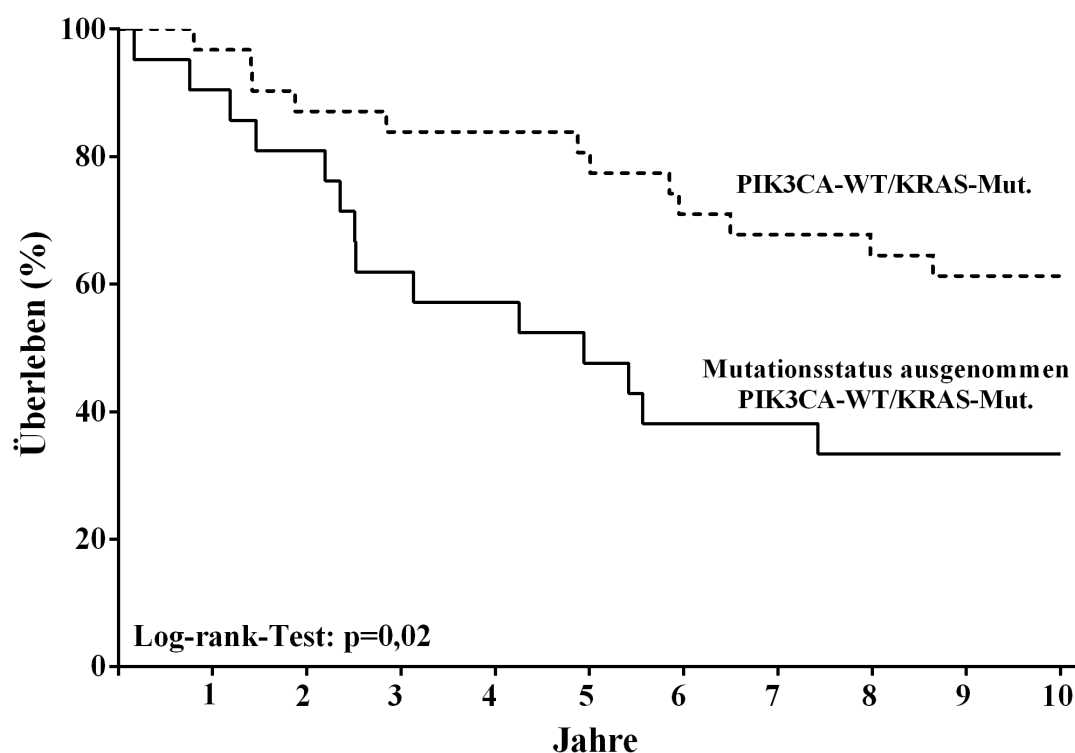
Bei kombinierter Betrachtung des Mutationsstatus im KRAS- und PIK3CA-Gen zeigten sich unter den Patienten mit regelmäßiger ASS-Einnahme deutliche Unterschiede in Bezug auf die absoluten 10-Jahres-Überlebensraten. Dies ist Abb. 26 zu entnehmen. Patienten mit KRAS-Mut. und PIK3CA-WT zeigten eine absolute 10-Jahres-Überlebensrate von 61%, Patienten mit KRAS-WT und PIK3CA-WT zeigten eine absolute 10-Jahres-Überlebensrate von 46%, Patienten mit KRAS-Mut. und PIK3CA-Mut. zeigten eine absolute 10-Jahres-Überlebensrate von 20% und Patienten mit PIK3CA-Mut. und KRAS-WT zeigten eine absolute 10-Jahres-Überlebensrate von 0%.



Patienten mit regelmäßiger ASS-Einnahme	Anzahl der Patienten	Innerhalb von 10 Jahren nach Diagnosestellung verstorben	Innerhalb von 10 Jahren nach Diagnosestellung nicht verstorben
PIK3CA-WT/ KRAS-WT	13	7 (54%)	6 (46%)
PIK3CA-Mut./ KRAS-WT	3	3 (100%)	0 (0%)
PIK3CA-WT/ KRAS-Mut.	31	12 (39%)	19 (61%)
PIK3CA-Mut./ KRAS-Mut.	5	4 (80%)	1 (20%)

Abb. 26: Kaplan-Meier-Kurve, Patienten mit regelmäßiger ASS-Einnahme, absolute Überlebensrate nach Diagnosestellung des KRK in Abhängigkeit vom KRAS- und PIK3CA-Mutationsstatus, alle Kombinationen des Mutationsstatus.

Patienten mit PIK3CA-WT und KRAS-Mut. zeigten unter den Patienten mit regelmäßiger ASS-Einnahme im Log-rank-Test einen signifikanten Überlebensvorteil gegenüber Patienten mit allen anderen Kombinationen des Mutationsstatus (PIK3CA-WT/KRAS-WT, PIK3CA-Mut./KRAS-WT, PIK3CA-Mut./KRAS-Mut.; Log-rank-Test: HR=0,38; 95% KI=0,17-0,87; p=0,02; Abb. 27).

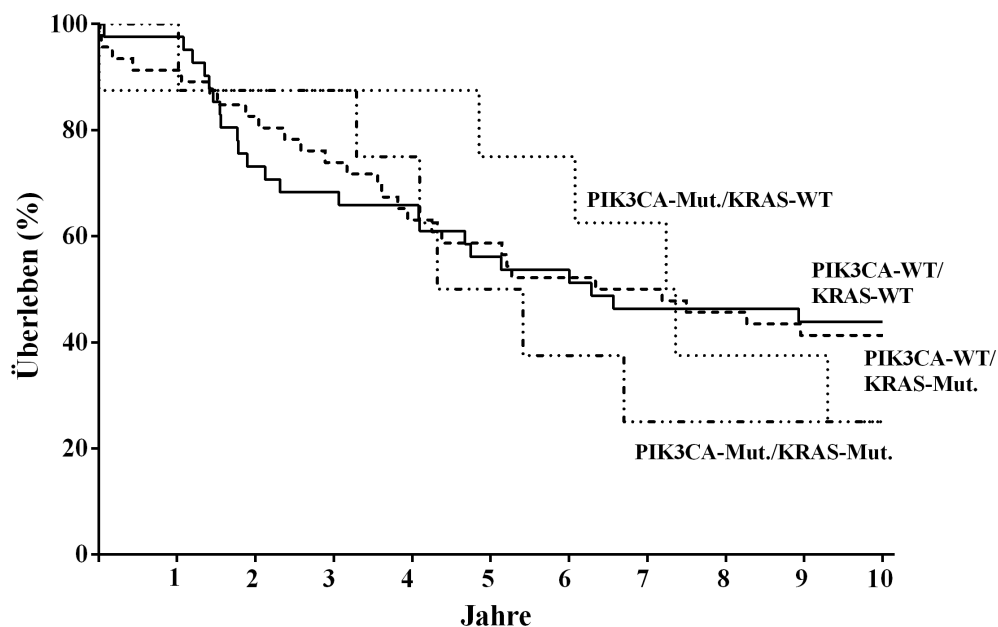


Patienten mit regelmäßiger ASS-Einnahme	Anzahl der Patienten	Innerhalb von 10 Jahren nach Diagnosestellung verstorben	Innerhalb von 10 Jahren nach Diagnosestellung nicht verstorben
PIK3CA-WT, KRAS-Mut.	31	12 (39%)	19 (61%)
Mutationsstatus ausgenommen PIK3CA-WT/KRAS-Mut.	21	14 (67%)	7 (33%)

Abb. 27: Kaplan-Meier-Kurve, Patienten mit regelmäßiger ASS-Einnahme, absolute Überlebensrate nach Diagnosestellung des KHK in Abhängigkeit vom KRAS- und PIK3CA-Mutationsstatus, PIK3CA-WT/KRAS-Mut. und Mutationsstatus ausgenommen PIK3CA-WT/KRAS-Mut. (PIK3CA-WT/KRAS-WT, PIK3CA-Mut./KRAS-WT, PIK3CA-Mut./KRAS-Mut.).

#### 4.6.3.2 Patienten ohne regelmäßige ASS-Einnahme

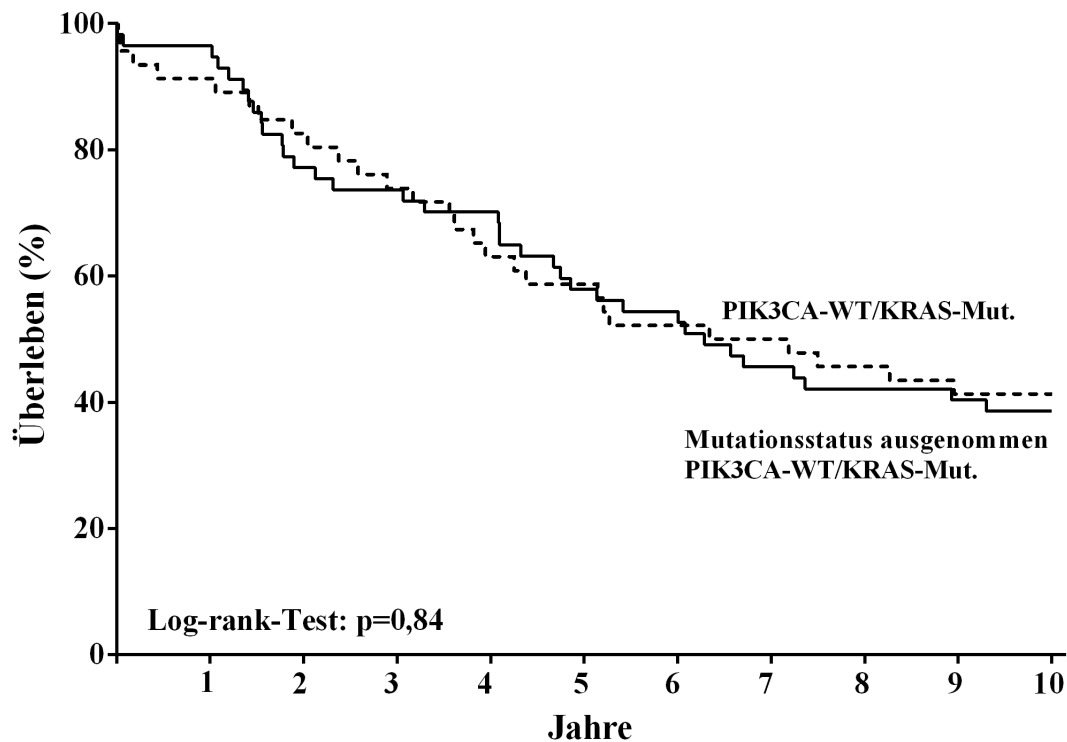
Bei kombinierter Betrachtung des Mutationsstatus im KRAS- und PIK3CA-Gen zeigten sich unter den Patienten ohne regelmäßige ASS-Einnahme weniger ausgeprägte Unterschiede in Bezug auf die absoluten 10-Jahres-Überlebensraten. Dies ist Abb. 28 zu entnehmen. Bei Betrachtung der Patienten ohne ASS-Einnahme zeigten Patienten mit PIK3CA-WT und KRAS-WT eine absolute 10-Jahres-Überlebensrate von 44%, Patienten mit PIK3CA-WT und KRAS-Mut. eine absolute 10-Jahres-Überlebensrate von 41% und Patienten mit PIK3CA-Mut. und KRAS-WT sowie Patienten mit PIK3CA-Mut. und KRAS-Mut. eine absolute 10-Jahres-Überlebensrate von 25%. Signifikante Unterschiede im OS zeigten sich nicht.



Patienten ohne regelmäßige ASS-Einnahme	Anzahl der Patienten	Innerhalb von 10 Jahren nach Diagnosestellung verstorben	Innerhalb von 10 Jahren nach Diagnosestellung nicht verstorben
PIK3CA-WT/ KRAS-WT	40	22 (55%)	18 (45%)
PIK3CA-Mut./ KRAS-WT	8	6 (75%)	2 (25%)
PIK3CA-WT/ KRAS-Mut.	45	26 (58%)	19 (42%)
PIK3CA-Mut./ KRAS-Mut.	8	6 (75%)	2 (25%)

Abb. 28: Kaplan-Meier-Kurve, Patienten ohne regelmäßige ASS-Einnahme, absolute Überlebensrate nach Diagnosestellung des KRK in Abhängigkeit vom KRAS- und PIK3CA-Mutationsstatus, alle Kombinationen des Mutationsstatus.

Im Gegensatz zu dem Ergebnis der Patienten mit regelmäßiger ASS-Einnahme zeigten Patienten mit PIK3CA-WT und KRAS-Mut. unter den Patienten ohne regelmäßige ASS-Einnahme im Log-rank-Test keinen Überlebensvorteil gegenüber Patienten mit allen anderen Kombinationen des Mutationsstatus (PIK3CA-WT/KRAS-WT, PIK3CA-Mut./KRAS-WT, PIK3CA-Mut./KRAS-Mut.; Log-rank-Test: HR=0,95; 95% KI=0,58-1,57;  $p=0,84$ ; Abb. 29).

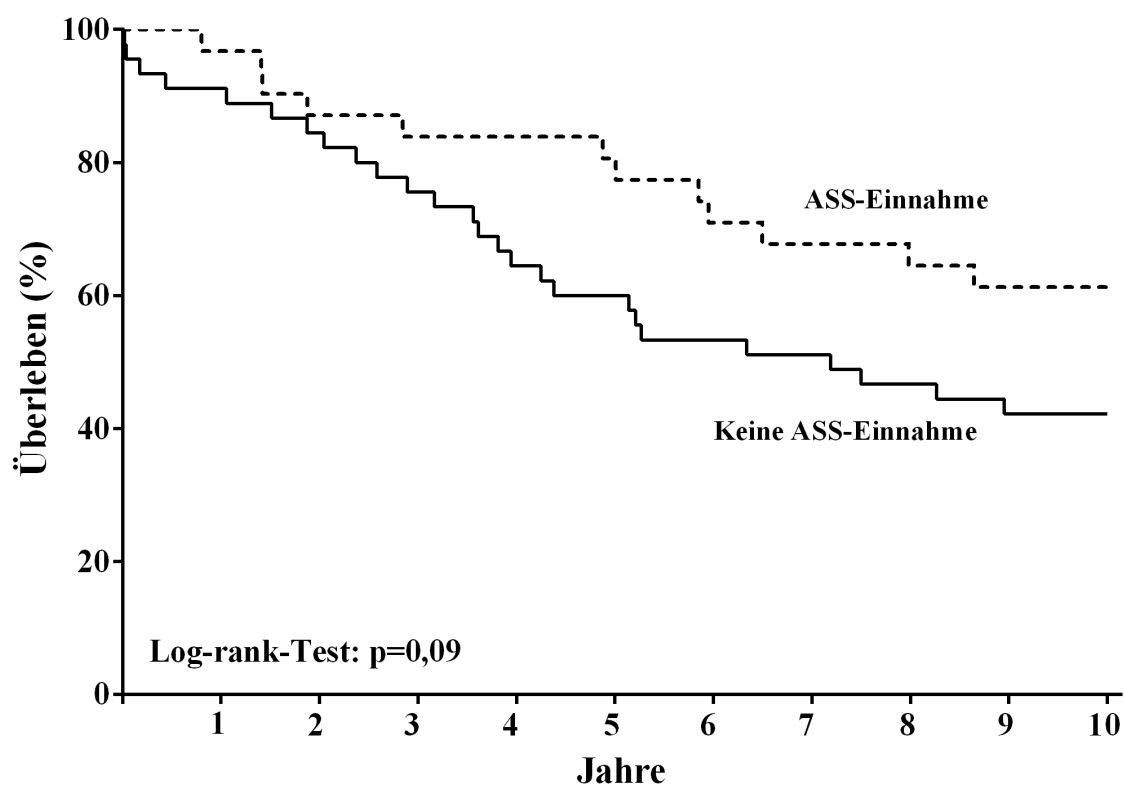


Patienten ohne regelmäßige ASS-Einnahme	Anzahl der Patienten	Innerhalb von 10 Jahren nach Diagnosestellung verstorben	Innerhalb von 10 Jahren nach Diagnosestellung nicht verstorben
PIK3CA-WT, KRAS-Mut.	45	26 (58%)	19 (42%)
Mutationsstatus ausgenommen PIK3CA-WT/KRAS-Mut.	56	34 (61%)	22 (39%)

Abb. 29: Kaplan-Meier-Kurve, Patienten ohne regelmäßige ASS-Einnahme, absolute Überlebensrate nach Diagnosestellung des KRK in Abhängigkeit vom KRAS- und PIK3CA-Mutationsstatus, PIK3CA-WT/KRAS-Mut. und Mutationsstatus ausgenommen PIK3CA-WT/KRAS-Mut. (PIK3CA-WT/KRAS-WT, PIK3CA-Mut./KRAS-WT, PIK3CA-Mut./KRAS-Mut.).

#### 4.6.4 Patienten mit PIK3CA-WT/KRAS-Mut.

Da Patienten mit gleichzeitigem Vorliegen von PIK3CA-WT und KRAS-Mut. nur unter den Patienten mit ASS-Einnahme einen signifikanten Überlebensvorteil zeigten, erfolgte die genauere Betrachtung dieser Patientengruppe. Bei Vergleich der Patienten mit und ohne regelmäßige Einnahme von ASS lag die absolute 10-Jahres-Überlebensrate bei Patienten mit KRAS-Mut., PIK3CA-WT und ASS-Einnahme bei 61%, wohingegen die absolute 10-Jahres-Überlebensrate bei Patienten mit KRAS-Mut., PIK3CA-WT ohne regelmäßige ASS-Einnahme bei 42% lag. Es zeigte sich im Log-rank-Test für die Patienten mit KRAS-Mut. und PIK3CA-WT ein Trend für einen Überlebensvorteil bei Einnahme von ASS (Log-rank-Test: HR=0,57; 95% KI=0,30-1,08; p=0,09; Abb. 30).



PIK3CA-WT/ KRAS Mut.	Anzahl der Patienten	Innerhalb von 10 Jahren nach Diagnosestellung verstorben	Innerhalb von 10 Jahren nach Diagnosestellung nicht verstorben
ASS-Einnahme	31	12 (39%)	19 (61%)
Keine ASS- Einnahme	45	26 (58%)	19 (42%)

Abb. 30: Kaplan-Meier-Kurve, Patienten mit PIK3CA-WT und KRAS-Mut., absolute Überlebensrate nach Diagnosestellung des KRK in Abhängigkeit vom ASS-Einnahmestatus.



## **5. Diskussion**

Ob eine regelmäßige ASS-Einnahme nach Diagnosestellung eines KRK eine Auswirkung auf das OS und/oder das krankheitsfreie Überleben (englisch: relapse-free survival, kurz: RFS) hat und ob es hierbei einen Zusammenhang mit dem PIK3CA-Mutationsstatus gibt, ist Bestandteil aktueller Forschung. Die Studien von Liao et al., Domingo et al., Reimers et al., Kothari et al. und Murphy et al., die sich mit einer ähnlichen Thematik wie diese Arbeit beschäftigt haben, werden im Folgenden als Referenzliteratur bezeichnet (Domingo et al. 2013; Kothari et al. 2015; Liao et al. 2012a; Murphy et al. 2017; Reimers et al. 2014).

### **5.1 Diskussion der Methoden**

#### **5.1.1 Studiendesign**

Bei dieser Arbeit handelte es sich um eine retrospektive, monozentrische Analyse. Alle bisher publizierten vergleichbaren Arbeiten, die sich mit der Rolle von PIK3CA als molekularer Biomarker für eine „adjuvante“ ASS-Therapie beim KRK beschäftigt haben, waren ebenfalls retrospektive Studien (Domingo et al. 2013; Gray et al. 2017; Kothari et al. 2015; Liao et al. 2012a; Murphy et al. 2017; Reimers et al. 2014).

Eine Stärke dieser Arbeit und des retrospektiven Studiendesigns stellt der lange Beobachtungszeitraum von 10 Jahren nach Diagnose des KRK dar. Die Referenzstudien von Domingo et al., Reimers et al., Kothari et al. und Murphy et al. weisen deutlich kürzere Beobachtungszeiträume (4,5-8 Jahre) auf (Domingo et al. 2013; Kothari et al. 2015; Murphy et al. 2017; Reimers et al. 2014).

Ein Nachteil des retrospektiven Studiendesigns ist, dass die ASS-Einnahme nicht randomisiert erfolgte. Die beiden Gruppen der Patienten mit und ohne ASS-Einnahme können daher große Unterschiede aufweisen. Da ASS beispielsweise in der Sekundärprophylaxe nach TIA, Schlaganfall und Myokardinfarkt verschrieben wird, wäre anzunehmen, dass in der Gruppe der Patienten mit regelmäßiger ASS-Einnahme prozentual mehr Patienten mit einem erhöhten kardiovaskulären Risiko, kardiovaskulären Erkrankungen und Folgeerkrankungen nach kardiovaskulären Ereignissen vorzufinden sind als in der Gruppe der Patienten ohne regelmäßige ASS-

Einnahme. Dieses würde sich, wie in einigen Vergleichsstudien aufgezeigt, in einer erhöhten Anzahl an Komorbiditäten oder erhöhten ASA-Werten zeigen (Murphy et al. 2017; Reimers et al. 2014). Eine Limitation dieser Arbeit ist, dass aufgrund des retrospektiven Studiendesigns und der vorhandenen Daten nicht ermittelt werden konnte, ob es einen Unterschied in der Anzahl der Begleiterkrankungen oder im gesundheitlichen Zustand zwischen Patienten mit und ohne regelmäßige ASS-Einnahme gab. Ein in etwa ähnliches OS könnte bereits ein Überlebensbenefit für die Gruppe der Patienten mit erhöhter Anzahl an Begleiterkrankungen darstellen. Alle bisher publizierten Studien sind allerdings ebenfalls retrospektiv und weisen ebenfalls Limitationen auf. Nur durch eine randomisierte prospektive Studie, bei der die Einnahme von ASS randomisiert auf Patienten mit KRK unabhängig von Vorerkrankungen verteilt wird, wäre es möglich, eine homogene Alters- und Komorbiditätenverteilung zwischen Patienten mit und ohne regelmäßige ASS-Einnahme zu erhalten und damit eine optimale Vergleichbarkeit zu erlangen.

Bisher wurde keine prospektive randomisierte Studie zur „adjuvanten“ Therapie mit ASS beim KRK publiziert. Wie in Kapitel 1.3.2.2 bereits erwähnt, gibt es allerdings zu dieser Thematik mit der ASCOLT-Studie und der Add-Aspirin-Studie derzeit rekrutierende prospektive, randomisierte klinische Studien (Ali et al. 2011; Coyle et al. 2016).

### **5.1.2 Probenrekrutierung, Mutationsanalysen**

Die Patientenproben dieser Arbeit stammen aus dem Archiv der Pathologie des Universitätsklinikums Marburg. Auch bei vergleichbaren Studien wurden die Proben als Paraffinblöcke aus Archiven rekrutiert (Domingo et al. 2013; Kothari et al. 2015; Liao et al. 2012a; Murphy et al. 2017; Reimers et al. 2014).

Zur Ermittlung des Mutationsstatus im PIK3CA-Gen wurde die Pyrosequenzierung angewendet. Diese wurde in der Studie von Liao et al. ebenfalls genutzt (Liao et al. 2012a). In den Arbeiten von Domingo et al., Reimers et al. und Kothari et al. wurde die Sanger-Sequenzierung zur Ermittlung des Mutationsstatus im PIK3CA-Gen verwendet (Domingo et al. 2013; Kothari et al. 2015; Reimers et al. 2014). Sowohl die Sanger-Sequenzierung als auch die Pyrosequenzierung sind verbreitete Sequenzierverfahren im Rahmen der Mutationsanalyse beim KRK. Die Isolierung, Vervielfältigung und Sequenzierung der Tumor-DNA wurde im Rahmen dieser Arbeit auf Basis von

etablierten Methoden des Instituts für Pathologie und des Labors für Hämatologie und Onkologie der Universitätsklinik Marburg durchgeführt.

## **5.2 Diskussion der Ergebnisse**

### **5.2.1 Patientenkollektiv**

In diese retrospektive Analyse wurden 153 Patienten mit histologisch gesichertem KRK, die im Universitätsklinikum Marburg in den Jahren 2003 bis 2004 operiert wurden, eingeschlossen. In vergleichbaren Studien variierte die Größe des Patientenkollektivs zwischen 393 und 964 Patienten (Liao et al. 2012a; Murphy et al. 2017). Es standen für diese Arbeit laut Dokumentationslisten der Pathologie 336 Patienten, die in den Jahren 2003/2004 auf Grund eines KRK am Universitätsklinikum Marburg operiert wurden, zur Verfügung. Aus verschiedenen Gründen konnten 183 Patienten nicht in die retrospektive Analyse eingeschlossen werden. Entweder hatten die Patienten nicht operable Fernmetastasen oder Zweittumore, es war kein oder nicht genug Tumorgewebe für die Mutationsanalyse vorhanden oder Daten über den ASS-Einnahmestatus oder die Überlebensdauer waren nicht verfügbar. In vergleichbaren Studien wurden ebenfalls eine Vielzahl von Patienten aus ähnlichen Gründen ausgeschlossen (Domingo et al. 2013; Liao et al. 2012a; Murphy et al. 2017; Reimers et al. 2014). Die geringere Patientenzahl im Vergleich zu den Referenzstudien stellt eine Limitation dieser Arbeit dar und sollte bei Betrachtung der Ergebnisse berücksichtigt werden. Eine Stärke des Patientenkollektivs dieser retrospektiven Analyse ist allerdings, dass es aufgrund der Verteilungsmuster der klinisch-pathologischen Daten (mittleres Erkrankungsalter, Geschlechterverteilung, ASS-Einnahmestatus, PIK3CA-Mutationsstatus, absolute Überlebensrate), wie im Verlauf aufgeführt, mit Daten des RKI und Daten der Vergleichsstudien sehr gut übereinstimmt und dadurch als ein qualitativ hochwertiges Querschnittskollektiv betrachtet werden kann (Domingo et al. 2013; Liao et al. 2012a; Murphy et al. 2017; Reimers et al. 2014; Robert Koch Institut 2015).

#### **5.2.1.1 ASS-Einnahmestatus**

52 der 153 Patienten (34%) des Patientenkollektivs nahmen regelmäßig ASS ein. In den Referenzstudien lag der prozentuale Anteil der Patienten mit regelmäßiger ASS-Einnahme zwischen 14% und 43% (Domingo et al. 2013; Liao et al. 2012a). Daher lag der

prozentuale Anteil der Patienten mit regelmäßiger ASS-Einnahme in dieser Arbeit im Rahmen der zu erwartenden Häufigkeit.

In unserer retrospektiven Analyse wurden Informationen über den ASS-Einnahmestatus retrospektiv durch Patientenakten und Informationen von behandelnden Ärzten ermittelt. Ein einmaliger Eintrag bzw. ein einmaliger nicht vorhandener Eintrag über den ASS-Einnahmestatus in der Patientenakte war hierfür nicht ausreichend. Eine Stärke dieser Analyse war, dass eine regelmäßige ASS-Einnahme ab Diagnosestellung im gesamten Beobachtungszeitraum zudem vom Hausarzt bestätigt oder verneint werden musste. Die Kriterien einer regelmäßigen ASS-Einnahme sind Abschnitt 3.7.2.3 zu entnehmen. Patienten, bei denen der ASS-Einnahmestatus nicht eindeutig ermittelt werden konnte, wurden aus unserer retrospektiven Analyse ausgeschlossen. Ein direkter Patientenkontakt war in dieser retrospektiven Analyse nicht möglich. Es konnte daher nicht eindeutig ermittelt werden ob die Patienten verschriebenes ASS wirklich eingenommen hatten. Ebenfalls wurden Patienten, die ohne Mitteilung an Ärzte regelmäßig ASS eingenommen hatten, nicht als regelmäßige ASS-Einsteher erfasst.

Auch vergleichbare Studien zeigen im Hinblick auf die Ermittlung der regelmäßigen ASS-Einnahme Limitationen. In der Arbeit von Murphy et al. wurden der ASS-Einnahmestatus retrospektiv den Krankenakten zum Zeitpunkt der Diagnose entnommen, dieses war bei 19% der Patienten nicht möglich. Die zugrundeliegende Ursache der ASS-Einnahme wurde nicht dokumentiert (Murphy et al. 2017). Es ist fraglich ob ein einmaliger Krankenakteneintrag die Patienten mit ausreichender Sicherheit in die Gruppen „regelmäßige ASS-Einnahme nach Diagnosestellung“ und „keine regelmäßige ASS-Einnahme nach Diagnosestellung“ unterteilen kann. Auch Patienten deren regelmäßige ASS-Einnahme kurze Zeit nach Diagnosestellung des KHK beendet wurde, wurden in dieser Studie als Patienten mit regelmäßiger ASS-Einnahme nach Diagnosestellung des KHK geführt. Daten über den ASS-Einnahmestatus wurden bei der Studie von Reimers et al. der „PHARMO database network“ entnommen. PHARMO ist ein unabhängiges Forschungsunternehmen das Daten von verschiedenen Gesundheitseinrichtungen in den Niederlanden speichert. Wie in dieser Arbeit wurde somit kein direkter Kontakt zum Patienten aufgenommen.

In der Arbeit von Liao et al. wurden die Patienten schriftlich kontaktiert und bezüglich ihres ASS-Einnahmestatus befragt (Liao et al. 2012a). Hierbei wurden die Patienten zwar persönlich kontaktiert, allerdings konnte nicht sichergestellt werden, ob die Patienten den Fragebogen komplett gelesen und verstanden hatten.

In der Studie von Domingo et al. wurden die Informationen bezüglich der ASS-Einnahme an den Follow-up Untersuchungsterminen (3-24 Monate) direkt vom Patienten erfragt (Domingo et al. 2013). Hier fand also eine Erhebung des ASS-Einnahmestatus prospektiv statt. Dies stellt wahrscheinlich die beste Möglichkeit dar den ASS-Einnahmestatus mit ausreichender Sicherheit zu ermitteln.

### **5.2.1.2 Absolute Überlebensraten**

Die absolute Überlebensrate aller Patienten nach 10 Jahren betrug im gesamten Patientenkollektiv 44% (67/153). Die absolute Überlebensrate der Frauen betrug nach 10 Jahren 48% und die der Männer 40%. Auch nach Daten des RKI ist die absolute Überlebensrate beim KRK bei Frauen höher als bei den Männern. Hier betrug die absolute Überlebensrate nach 10 Jahren im Jahr 2012 bei den Männern 38% und bei den Frauen 40% (Robert Koch Institut 2015). Die Überlebensraten dieser Arbeit entsprechen daher in etwa den vom RKI berichteten Überlebensdaten. Die unizentrische Kohorte dieser retrospektiven Analyse kann somit diesbezüglich als repräsentativ angesehen werden.

## **5.2.2 Mutationsanalysen und Prognose**

In dieser retrospektiven Analyse wurden die Mutationsfrequenzen im PIK3CA- und KRAS-Gen ermittelt.

### **5.2.2.1 Mutationsfrequenz im PIK3CA-Gen**

In dieser retrospektiven Analyse betrug die mittels Pyrosequenzierung ermittelte Mutationsfrequenz des PIK3CA-Gens 16%. Ein Drittel aller Mutationen fand sich im Exon 20 des PIK3CA-Gens, wohingegen zwei Drittel der Mutationen im Exon 9 des PIK3CA-Gens vorlagen. Doppelmutationen von Exon 9 und Exon 20 fanden sich nicht. Vergleicht man dieses Ergebnis mit der internationalen Literatur, so reiht sich das Ergebnis dieser retrospektiven Analyse in die Ergebnisse anderer Autoren ein. In den Referenzstudien, die sich mit dem PIK3CA-Mutationsstatus und dem ASS-Einnahmestatus beschäftigt haben, lag die Mutationsfrequenz im PIK3CA-Gen

zwischen 11,6% und 16,7% (Domingo et al. 2013; Liao et al. 2012a). Auch in anderen Studien, die sich mit der Mutationsfrequenz im PIK3CA beschäftigt haben, lag diese zwischen 10% und 20% (Barault et al. 2008; Liao et al. 2012b; Prenen et al. 2009; Roock et al. 2010; Saridaki et al. 2011). In der Arbeit von Domingo et al. zeigten 30% der Patienten mit mutiertem PIK3CA-Gen eine Mutation in Exon 20. Demnach zeigt sich im Vergleich zu dieser Arbeit ein sehr ähnliches Mutationsspektrum.

#### **5.2.2.2 Mutationsfrequenz im KRAS-Gen**

In dieser Arbeit betrug die Mutationsfrequenz des KRAS-Gen 57%. In anderen Studien lag die Mutationsfrequenz zwischen 30-50% (Berg et al. 2010; Bos et al. 1987; Breivik et al. 1994; Brink et al. 2003; Finkelstein et al. 1993; Samowitz et al. 2001). Die Mutationsfrequenz in diesem Patientenkollektiv liegt damit höher als in anderen Studien, insbesondere als in den Referenzstudien. In der genetisch heterogenen Gruppe der KRK sind regionale Unterschiede möglich, die das erklären könnten.

#### **5.2.2.3 Mutationsstatus im PIK3CA-Gen und OS**

Statistisch signifikant war in dieser Arbeit der Einfluss des PIK3CA-Mutationsstatus auf das OS. Patienten mit PIK3CA-WT wiesen einen signifikanten Überlebensvorteil gegenüber Patienten mit PIK3CA-Mut. auf (Log-rank-Test: HR=0,59; 95% KI=0,29-0,96, p=0,04; Abb. 19). Die Daten dieser Arbeit unterstützen damit die Hypothese, dass der PIK3CA-Mutationsstatus einen prognostischen Biomarker beim KRK darstellt.

Mehrere Studien haben sich mit der prognostischen Rolle des PIK3CA-Mutationsstatus beschäftigt. Die prognostische Bedeutung einer PIK3CA-Mut. beim KRK ist aber weiterhin unklar. Einige Studien und Metaanalysen zeigten keinen prognostischen Effekt vom PIK3CA-Mutationsstatus auf das OS oder das RFS (Abubaker et al. 2008; Mei et al. 2016; Palomba et al. 2016). Andere Studien wiederum konnten, wie in dieser Arbeit gezeigt, einen negativen prognostischen Effekt einer PIK3CA-Mut. aufzeigen (Kato et al. 2007; Liao et al. 2012b; Ogino et al. 2009; Reggiani Bonetti et al. 2018; Li et al. 2017; Jang et al. 2017). In einer Studie von Kato et al. ergab sich für Patienten mit einer Mutation im PIK3CA-Gen ein signifikant kürzeres RFS (Kato et al. 2007). Auch in einer Studie von Ogino et al. hatten Patienten mit Mutationen im PIK3CA-Gen ein kürzeres krebsspezifisches Überleben (Ogino et al. 2009). In einer Studie von Liao et al. zeigten

nur Patienten mit gleichzeitiger Mutation im Exon 9 und Exon 20 des PIK3CA-Gens eine schlechtere Prognose (Liao et al. 2012b).

Wie bereits in Kapitel 1.2.2 beschrieben, spielt der PI3K-Signalweg eine gesicherte Rolle in der Entstehung des KRK. Durch Mutationen im PIK3CA-Gen kommt es zu einer konstitutiv aktiven Lipid-Kinase-Aktivität, sodass nachgeschaltete Signalwege trotz Abwesenheit von Wachstumsfaktoren aktiviert werden können (Ikenoue et al. 2005; Kang et al. 2005). Dadurch kann eine Mutation im PIK3CA-Gen kolorektaler Karzinomzellen zu vermehrter Unabhängigkeit der Zelle von Wachstumsfaktoren, einer verminderten Apoptoserate und erleichterter Tumordinvasion führen (Samuels et al. 2005).

Um zu klären, inwiefern die mit einer PIK3CA-Mut. einhergehenden Veränderungen bei Patienten mit KRK prognostische Bedeutung haben und ob der PIK3CA-Mutationsstatus gegebenenfalls nur in Kombination mit weiteren Faktoren prognostische Bedeutung hat, sind weitere Studien erforderlich. Nur so lässt sich die Rolle von PIK3CA als prognostischer Biomarker beim KRK klären.

### 5.2.3 ASS-Einnahmestatus in Bezug auf das OS

Wie bereits erwähnt konnte in einigen retrospektiven Analysen und Metaanalysen gezeigt werden, dass eine ASS-Einnahme nach Diagnosestellung eines KRK zu einem signifikant besseren OS und/oder krebsspezifischem Überleben führt (Bains et al. 2016; Coghill et al. 2011; Goh et al. 2014; Gray et al. 2017; Li et al. 2015; Liao et al. 2012a; McCowan et al. 2013; Ng et al. 2015; Rothwell et al. 2010; Ye et al. 2014). Unter anderem in zwei der Referenzstudien zeigte sich kein Überlebensvorteil bei einer regelmäßigen ASS-Einnahme nach Diagnosestellung des KRK (Kothari et al. 2015; Murphy et al. 2017). In dieser Studie war ebenfalls kein signifikant besseres Outcome im Gesamtkollektiv der Patienten mit ASS-Einnahme erkennbar (Log-rank-Test: HR=0,77; 95% KI=0,5-1,22; p=0,29, Abb. 21). Da davon auszugehen ist, dass aufgrund der Heterogenität des KRK generell nicht alle Patienten mit KRK von einer ASS-Einnahme profitieren, sondern nur Patienten mit bestimmten molekularen Biomarkern, wäre eine mögliche Erklärung, dass das kleine Patientenkollektiv dieser Arbeit zu wenige Patienten mit ASS-Einnahme und prognostisch günstigen Biomarkern umfasst, um eine signifikante Veränderung im OS des Gesamtkollektivs zu zeigen.

### 5.2.3.1 ASS-Einnahme in Bezug auf den PIK3CA- und KRAS-Mutationsstatus

Um herauszufinden, ob sich in Subgruppen ein verlängertes OS bei regelmäßiger ASS-Einnahme nach Diagnosestellung zeigt, wurde das Patientenkollektiv in verschiedene Kohorten unterteilt. Die Patientenzahl ist hierbei als kritische Größe zu sehen. Durch Bildung von Subgruppen enthielten die einzelnen Kohorten eine geringere Patientenzahl, welche bei Betrachtung der Ergebnisse zu berücksichtigen ist.

In dieser Arbeit konnte unter allen Patienten mit regelmäßiger ASS-Einnahme für die Patienten mit PIK3CA-WT ein signifikanter Überlebensvorteil gegenüber Patienten mit PIK3CA-Mut. aufgezeigt werden (Log-rank-Test: HR=0,33; 95% KI=0,05-0,62;  $p < 0,01$ ; Abb. 22). Dieser Überlebensvorteil zeigte sich unter den Patienten ohne regelmäßige ASS-Einnahme nicht (Log-rank-Test: HR=0,78; 95% KI=0,38-1,51;  $p=0,43$ ; Abb. 23). Zudem zeigte sich unter allen Patienten mit regelmäßiger ASS-Einnahme für die Patienten mit KRAS-Mut. ein Trend für einen Überlebensvorteil gegenüber Patienten mit KRAS-WT (Log-rank-Test: HR=0,51; 95% KI=0,2-1,11,  $p=0,09$ ; Abb. 24). Dieser Trend zeigte sich unter den Patienten ohne regelmäßige ASS-Einnahme nicht (Log-rank-Test: HR=1,02; 95% KI=0,61-1,7;  $p=0,93$ ; Abb. 25). Bei kombinierter Betrachtung des PIK3CA- und KRAS-Mutationsstatus zeigte sich unter den Patienten mit regelmäßiger ASS-Einnahme für Patienten mit PIK3CA-WT und KRAS-Mut. ein signifikanter Überlebensvorteil gegenüber Patienten mit anderen Kombinationen des Mutationsstatus (Log-rank-Test: HR=0,38; 95% KI=0,17-0,87,  $p=0,02$ ; Abb. 27). Dieser Überlebensvorteil zeigte sich bei Patienten ohne regelmäßige ASS-Einnahme nicht (Log-rank-Test: HR=0,95; 95% KI=0,58-1,57,  $p=0,84$ ; Abb. 29). Für Patienten mit KRAS-Mut., PIK3CA-WT und ASS-Einnahme zeigte sich ein Trend für einen Überlebensvorteil gegenüber Patienten mit KRAS-Mut., PIK3CA-WT ohne ASS-Einnahme (Log-rank-Test: HR=0,57; 95% KI=0,30-1,08,  $p=0,09$ ; Abb. 30).

Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen zusammenfassend vermuten, dass vor allem Patienten mit der Kombination von PIK3CA-WT und KRAS-Mut. von einer ASS-Einnahme nach Diagnosestellung des KRK profitieren. Die Studienlage ist diesbezüglich sehr heterogen (Domingo et al. 2013; Kothari et al. 2015; Liao et al. 2012a; Murphy et al. 2017; Reimers et al. 2014).

In der Studie von Liao et al. zeigte sich im Gegensatz zu dieser Arbeit ein signifikant verlängertes OS für Patienten mit Mutation im PIK3CA-Gen bei regelmäßiger ASS-



Einnahme nach Diagnosestellung des KRK, nicht aber für Patienten mit regelmäßiger ASS-Einnahme und PIK3CA-WT (Liao et al. 2012a). Auch in einer Studie von Domingo et al. zeigte sich ein signifikant verlängertes RFS für Patienten mit Mutation im PIK3CA-Gen bei regelmäßiger ASS-Einnahme nach Diagnosestellung (Domingo et al. 2013).

In einer Studie von Reimers et al. zeigten Patienten mit regelmäßiger ASS-Einnahme und PIK3CA-WT ein signifikant längeres OS als Patienten mit PIK3CA-WT ohne regelmäßige ASS-Einnahme (adjustiertes Relatives Risiko=0,55; 95% KI=0,40-0,75;  $p<0,001$ ), wohingegen Patienten mit PIK3CA-Mut. und regelmäßiger ASS-Einnahme dieses nicht aufwiesen (Reimers et al. 2014).

Eine aktuelle Studie von Murphy et al. sowie eine Studie von Kothari et al. konnten keinen signifikanten Zusammenhang zwischen dem PIK3CA-Mutationsstatus und einer Verlängerung des OS bei ASS-Einnahme feststellen (Kothari et al. 2015; Murphy et al. 2017).

Auch in Bezug auf den KRAS-Mutationsstatus ist die Studienlage heterogen. Im Gegensatz zu den Ergebnissen dieser Arbeit, zeigte sich in einer Arbeit von Hua et. al ein verlängertes OS bei „adjuvanter“ Einnahme von ASS oder anderen NSAR nur bei Pat. mit KRAS-WT (Hua et al. 2017). Demgegenüber zeigte sich in einer Arbeit von Frouws et al. kein Unterschied im OS bei KRAS-Mut. und KRAS-WT KRK bei „adjuvanter“ Einnahme von ASS (Frouws et al. 2017b). Ein Überlebensvorteil bei kombiniertem Vorliegen eines PIK3CA-WT und einer KRAS-Mut. bei ASS-Einnahme wurden bisher nicht beschrieben.

Da es sich beim KRK um eine komplexe Erkrankung handelt ist davon auszugehen, dass Kombinationen aus prognostischen Faktoren und nicht einzelne Biomarker allein das Ansprechen auf eine „adjuvante“ Therapie mit ASS beeinflussen. Eine mögliche Erklärung für die divergenten Ergebnisse wäre daher, dass sich die Patientenkollektive in Hinblick auf molekulare Tumoreigenschaften und damit auch in Bezug auf weitere prognostische Marker unterscheiden. Beim Vergleich des Patientenkollektivs dieser Arbeit mit dem Patientenkollektiv der Arbeit von Liao et al. fanden sich unter anderem Unterschiede in der Tumorlokalisation, der Geschlechterverteilung und im KRAS-Mutationsstatus. Dies könnte auf sich in Bezug auf molekulare Tumoreigenschaften unterscheidende Patientenkollektive hinweisen. In dieser Arbeit wiesen 25% der Patienten ein rechtsseitiges KRK auf, wohingegen der Anteil von Patienten mit

rechtsseitigem KRK in der Arbeit von Liao et al. mit 45% deutlich höher lag. Linksseitige KRK und rechtsseitige KRK zeigen eine unterschiedliche Verteilung an Mutationen sowie prognostische Unterschiede (Lee et al. 2017). Beispielsweise nimmt das Auftreten von Mikrosatelliteninstabilität und Mutationen im BRAF-Gen vom Rektum bis zum proximalen Colon zu (Lee et al. 2017; Yamauchi et al. 2012). Beide Kollektive könnten sich daher in Bezug auf weitere Mutationen stark unterscheiden. Zudem wiesen im Kollektiv dieser Arbeit 57% der Patienten eine KRAS-Mut. auf und in der Arbeit von Liao et al. 35%. Auch dies zeigt, dass die Kollektive auf molekularer Ebene deutliche Unterschiede aufweisen, am ehesten bedingt durch regionale Unterschiede der genetisch heterogenen KRK. Der Vergleich der beiden Patientenkollektive bezüglich weiterer in der Literatur erwähnter prognostischer Marker war aufgrund von nicht vorliegenden Daten nicht möglich. In der Arbeit von Liao et al. profitierten beispielsweise Patienten mit PIK3CA-Mut. und gleichzeitiger PTGS2-Expression von der Einnahme von ASS (Liao et al. 2012a). In der Arbeit von Reimers et al. zeigten Patienten, deren Tumorzellen HLA-Klasse 1-Antigene präsentierten, bei Einnahme von ASS ein längeres OS als Patienten ohne ASS-Einnahme (Reimers et al. 2014). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die gemeinsame Betrachtung des PIK3CA- und KRAS-Mutationsstatus eine entscheidende Rolle spielen könnte. Dieser Zusammenhang wurde in den anderen Arbeiten nicht betrachtet.

Zusammenfassend sind daher große prospektive randomisierte Studien erforderlich, die ein Ansprechen einer „adjuvanten“ Therapie mit ASS beim KRK unter Betrachtung verschiedener Kombinationen an möglichen Biomarkern evaluieren. Ziel ist es daher, weitere Biomarker zu identifizieren, die in Kombination für die Entscheidung für eine „adjuvanten“ ASS Therapie beim KRK eingesetzt werden könnten.

#### **5.2.3.2 Mögliche Wirkmechanismen von ASS in Bezug auf den PIK3CA- und KRAS-Mutationsstatus**

Für die Identifizierung entsprechender Biomarker wäre es wichtig die Wirkmechanismen von ASS beim KRK zu verstehen. Die genauen Wirkmechanismen mit denen ASS die Prognose beim KRK verbessern könnte sind Bestandteil aktueller Forschung. Es ist möglich, dass es mehrere Wege gibt auf denen ASS seine Wirkung entfaltet. Die krebsprotektive und prognoseverbessernde Wirkung von ASS und verschiedenen NSAR bei verschiedenen soliden Tumoren scheint, wie bereits erwähnt,

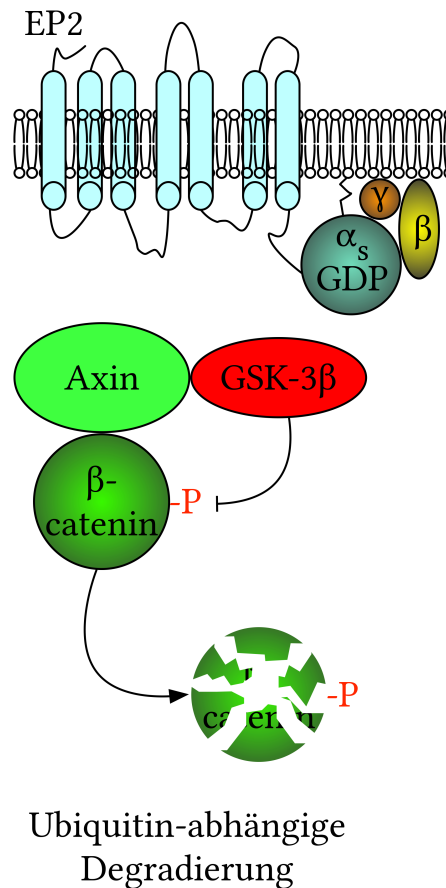
einerseits über COX-vermittelt, andererseits über zahlreiche andere COX-unabhängige Signalwege zu erfolgen (Abnet et al. 2009; Cuzick et al. 2009; Jacobs et al. 2005; Takkouche et al. 2008; Wu et al. 2010).

Eine COX-2 Überexpression im KRK und die damit einhergehende Erhöhung des Prostaglandin E<sub>2</sub> wurde in mehreren Studien beobachtet und spielt eine Rolle in der Entstehung des KRK (Eberhart CE et al. 1994; Sano et al. 1995). Es wurde in mehreren Arbeiten gezeigt, dass Signalwege im KRK, wie beispielsweise der PI3K-Signalweg, durch von COX-2 gebildetes PGE<sub>2</sub> aktiviert werden und somit zu Zellwachstum, Angiogenese, Zellinvasion und Apoptose-Hemmung beitragen (Buchanan et al. 2003; Leone et al. 2007; Pai et al. 2002; Sheng et al. 2001). Auf der anderen Seite induzieren durch PGE<sub>2</sub> aktivierte Signalwege, die unter anderem die PI3K einschließen, die COX-2-Expression im Rahmen einer Feedbackschleife (Fujino et al. 2015; Wang und DuBois 2008; Yoshida et al. 2013).

Wenn das PIK3CA-Gen einen Biomarker für eine Therapie mit ASS darstellt, müsste die PI3K in einen Signalweg eingebunden sein, in dem ASS seine prognoseverbessernde Wirkung beim KRK erzielt. Wenn die prognoseverbessernde Wirkung von ASS beim KRK über eine Hemmung der COX-2 erzielt werden würde, stellt sich die Frage ob die Hemmung der COX-2 in einem PI3K einschließenden Signalweg ihre Hauptwirkung nachgeschaltet oder vorgeschaltet von der PI3K zeigt. Würde die COX-2-Hemmung ihre Hauptwirkung vorgeschaltet von der PI3K entfalten, wäre es plausibel, dass vor allem Patienten ohne Mutation im PIK3CA-Gen von einer Therapie mit ASS profitieren könnten, da Patienten mit Mutation im PIK3CA-Gen, wie zuvor beschrieben, eine konstitutiv aktive PI3K aufweisen die weitgehend unabhängig von vorgestellten Signalwegen agiert. Würde die COX-2-Hemmung in einem Signalweg nachgeschaltet von der PI3K ihre Hauptwirkung zeigen, könnten vor allem Patienten mit mutiertem PIK3CA-Gen profitieren, da dann das aufgrund der konstitutiv aktiven PI3K überexprimierte COX-2 durch ASS gehemmt würde. Die Ergebnisse dieser Arbeit würden die Theorie untermauern, dass vor allem die vorgeschaltet von der PI3K agierende COX-2 durch ASS gehemmt wird.

Laut Castellone et al. befindet sich die COX-2 in einem Signalweg vorgeschaltet von der PI3K. Durch das von COX-2 produzierte PGE<sub>2</sub> wird das Wachstum von kolorektalen Karzinomen über den Gs-Axin- $\beta$ -Catenin Signalweg gesteigert. Der folgende Abschnitt

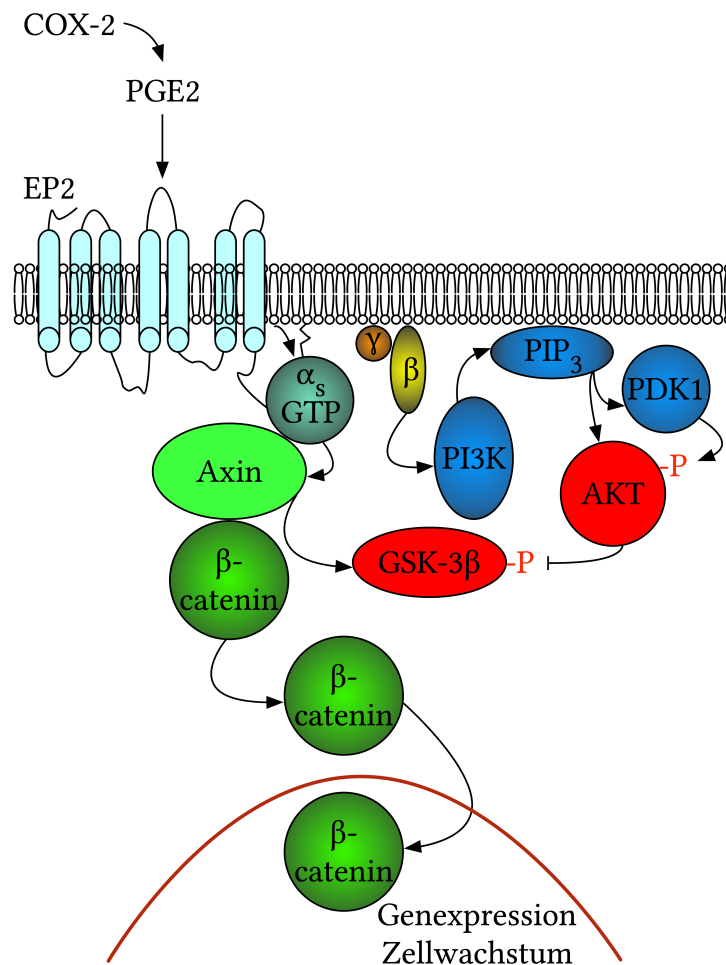
bezieht sich auf das von Castellone et al. vermutete Zusammenspiel zwischen der COX-2 und der PI3K (Castellone et al. 2005). In nicht stimulierten Zellen bewirkt ein Komplex aus GSK-3 $\beta$  und Axin die inhibierende Phosphorylierung von  $\beta$ -Catenin und damit seine ubiquitin-abhängige Degradierung. Dieses ist schematisch in Abb. 31 dargestellt.



**Abb. 31: Schematische Darstellung der Ubiquitin-abhängigen Degradierung von  $\beta$ -Catenin in nicht stimulierten Zellen.** Quelle: Eigene Darstellung, basierend auf (Castellone et al. 2005).

Eine Überexpression von COX-2 im KRK führt dazu, dass vermehrt PGE<sub>2</sub> gebildet wird. Das PGE<sub>2</sub> bindet an den G-Protein gekoppelten PGE<sub>2</sub>-Rezeptor EP2. Eine Aktivierung des EP2-Rezeptors führt zu einem Austausch von GDP durch GTP und zu einer Verbindung der  $\alpha$ -Untereinheit des G-Proteins mit Axin. Dadurch wird GSK-3 $\beta$ , welches zuvor im Komplex mit Axin vorlag, freigesetzt. Die nun freien G-Protein Untereinheiten  $\beta$  und  $\gamma$  stimulieren das Aktivitätsniveau der PI3K, sodass über den AKT-Signalweg vermehrt GSK-3 $\beta$  phosphoryliert und damit gehemmt wird. Dadurch wird  $\beta$ -Catenin vermindert phosphoryliert und degradiert. Dies führt dazu, dass die  $\beta$ -Catenin abhängigen Gene, die beispielsweise zur Wachstumsförderung führen, durch

verminderte Hemmung von  $\beta$ -Catenin vermehrt exprimiert werden können (Castellone et al. 2005). Dieses ist schematisch in Abb. 32 dargestellt.



**Abb. 32: PGE2 abhängige Genexpression und Zellwachstum in Folge einer Überexpression von COX-2.** Quelle: Eigene Darstellung, basierend auf (Castellone et al. 2005).

Dieser Zusammenhang konnte auch in vitro in einer experimentellen Arbeit von Uddin et al. an Ovarialkarzinomzellen der Maus gezeigt werden. Durch die Hemmung der überexprimierten COX-2 durch ASS wurde der Downstreamsignalweg von PI3/AKT runterreguliert (Uddin et al. 2010).

Demgegenüber beschrieben Di Popolo et al., dass der PI3K-AKT-Signalweg die COX-2 mRNA induziert (Di Popolo et al. 2000). Hierdurch könnte bei Mutation im PIK3CA-Gen durch eine konstitutiv aktive PI3K vermehrte COX produziert werden. ASS könnte durch eine Inaktivierung des vermehrt produzierten COX wirken. In diesem Fall würden vor allem Patienten mit PIK3CA-Mut. von einer ASS-Therapie profitieren. In den Studien von Liao et al. und Domingo et al. konnte dies nicht untermauert werden,

da keine vermehrte Überexpression von COX-2 mRNA bei Patienten mit PIK3CA-Mut. im Vergleich zu Patienten ohne PIK3CA-Mut. gefunden wurde (Domingo et al. 2013; Liao et al. 2012a).

Wenn das KRAS-Gen einen Biomarker für eine Therapie mit ASS darstellen könnte, müsste KRAS in einen Signalweg eingebunden sein, in dem ASS seine prognoseverbessernde Wirkung beim KRK erzielt. Auf molekularer Ebene konnte gezeigt werden, dass mutiertes BRAF und KRAS den MAPK Signalweg beeinflussen und es dadurch zu einer Hochregulation der COX-2 kommt (Wagner und Nebreda 2009). Dies könnte erklären, dass vor allem Patienten mit einer KRAS-Mut. von einer „adjuvanten“ Einnahme von ASS profitieren. Generell wäre es daher möglich, dass der KRAS-Mutationsstatus ein möglicher Biomarker für eine COX-2 hemmende Therapie mit ASS darstellt.

Da nicht davon auszugehen ist, dass der PIK3CA-Mutationsstatus oder der KRAS-Mutationsstatus den einzigen relevanten Biomarker für das Ansprechen einer Therapie mit ASS beim KRK darstellt, sind die zuvor genannten Zusammenhänge abhängig von weiteren Parametern. Es ist möglich, dass nur Patienten mit einem gleichzeitigen Auftreten bestimmter Biomarker von einer „adjuvanten“ ASS-Therapie profitieren. In dieser Arbeit wurde das gemeinsame Vorhandensein von PIK3CA-WT und KRAS-Mut. mit einem Überlebensvorteil bei Einnahme von ASS assoziiert. In einer Arbeit von Gao et al. mit menschlichen uterinen Leiomyosarkomzellen konnte gezeigt werden, dass ASS das Zellwachstum der malignen Zellen durch die Regulierung der K-Ras-p110 $\alpha$  Interaktion hemmt (Gao et al. 2017). Es wurde gezeigt, dass die Interaktion zwischen K-Ras und p110 $\alpha$  nach Zugabe von ASS signifikant abnimmt und es zu einer Hemmung der Zellproliferation sowie einem Zellzyklusarrest in der G0/G1-Phase kommt. In Zellen mit überexprimiertem K-Ras zeigte sich eine verstärkte K-Ras-p110 $\alpha$  Interaktion und der Anteil an phosphoryliertem PI3K p85 und phosphoryliertem AKT war deutlich erhöht. Nach Zugabe von ASS zeigte sich eine Abnahme des phosphorylierten PI3K p85 und AKT, die Zellproliferation wurde gehemmt und einen Zellzyklusarrest in der G0/G1-Phase bewirkt. Im Gegensatz dazu zeigte sich bei Zellen mit verminderter KRAS-Expression eine verminderte KRAS-p110 $\alpha$  Interaktion mit verminderter Expression von phosphoryliertem p85 und AKT. Eine Zugabe von ASS zeigte hier keine weiteren Effekte (Gao et al. 2017).

Durch die Hemmung der K-Ras-p110 $\alpha$  Interaktion durch ASS wäre es plausibel, dass vor allem Patienten mit gleichzeitigem Auftreten von KRAS-Mut. und PIK3CA-WT von einer ASS-Einnahme profitieren. Um zu ermitteln, inwiefern diese Signalwege bei Patienten mit KRK im Rahmen der Therapie mit ASS eine Rolle spielen, sind weitere Studien erforderlich. Zudem sind die Ergebnisse der aktuell rekrutierenden, großen randomisierten Studien abzuwarten.

### **5.3 Ausblick**

Die „adjuvante“ ASS-Einnahme hat in einigen retrospektiven Analysen und Metaanalysen einen Benefit für Patienten mit KRK gezeigt. Dennoch sind die Nebenwirkungen von ASS nicht zu unterschätzen (Coyle et al. 2016b). Eine regelmäßige ASS-Einnahme führt zu einer Verdopplung des Risikos für gastrointestinale Blutungen. Bei Patienten >80 Jahre liegt die Blutungskomplikationsrate bei 0,7% (Elwood et al. 2009). Daher ist es wichtig, Patienten zu identifizieren, deren Überlebensvorteil durch eine ASS-Einnahme das Risiko von Komplikationen übersteigt. Es wurden mehrere mögliche Biomarker, wie beispielsweise der PIK3CA-Mutationsstatus suggeriert, die Datenlage ist aktuell aber sehr heterogen (Domingo et al. 2013; Kothari et al. 2015; Liao et al. 2012a; Murphy et al. 2017; Reimers et al. 2014). Die Ergebnisse dieser Arbeit verdeutlichen, dass die gemeinsame Betrachtung des PIK3CA- und KRAS-Mutationsstatus eine wichtige Rolle spielen könnte.

Es ist daher unumgänglich die Entstehung des KRK sowie die Wirksamkeit von ASS beim KRK auf molekularer Ebene genauer zu verstehen. Nur so kann deutlich werden, welche Gene als molekulare Biomarker fungieren können.

Zur weiteren Klärung der Rolle einer „adjuvanten“ ASS-Therapie existieren mit der ASCOLT-Studie („Aspirin for Dukes C and High Risk Dukes B Colorectal Cancers“) und der Add-Aspirin Studie zwei derzeit rekrutierende prospektive, randomisierte klinische Studien (Ali et al. 2011; Coyle et al. 2016a). Zudem gibt es aktuell rekrutierende randomisierte, Placebo-kontrollierte Studien welche die „adjuvante“ Einnahme von ASS bei Patienten mit PIK3CA-Mut. überprüfen (NCT02647099, NCT02467582).

Zusammenfassend unterstreichen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass für die Rolle des PIK3CA-Mutationsstatus als möglicher prognostischer Marker für das OS sowie als prädiktiver Marker für eine „adjuvante“ ASS-Therapie bei Patienten mit KRK große

prospektive Studien erforderlich sind. Aufgrund der aktuellen Studienlage und des nicht zu unterschätzenden Nebenwirkungsprofil von ASS sollte bei Patienten mit KRK eine „adjuvante“ ASS-Therapie nur im Rahmen von Studien erfolgen.



## Zusammenfassung

Je mehr über die molekularen Eigenschaften, die zu Entstehung, Wachstum und Metastasierung des kolorektalen Karzinoms führen, bekannt wird, desto größer wird der Wunsch nach einer individualisierten Therapie für den einzelnen Patienten. Dafür werden molekulare Biomarker benötigt, die anzeigen, ob ein Patient aufgrund seiner Tumoreigenschaften von einer bestimmten Therapie profitieren könnte.

In verschiedenen retrospektiven Analysen und Metaanalysen konnte ein Überlebensvorteil durch eine „adjuvante“ Einnahme von Acetylsalicylsäure bei Patienten mit kolorektalem Karzinom gezeigt werden. Als molekularer Biomarker für das Ansprechen der Therapie mit Acetylsalicylsäure wurde der PIK3CA-Mutationsstatus in Erwägung gezogen. Ziel dieser Arbeit war es, zu überprüfen, ob der PIK3CA-Mutationsstatus und der KRAS-Mutationsstatus bei Patienten mit kolorektalem Karzinom geeignete molekulare Biomarker für die „adjuvante“ Therapie mit Acetylsalicylsäure, sowie geeignete prognostische Marker für das Gesamtüberleben, darstellen.

In diese retrospektive Analyse wurden 153 Patienten mit Erstdiagnose eines kolorektalen Karzinoms im Jahr 2003/2004 im Universitätsklinikum Marburg eingeschlossen. Die in Paraffin eingebetteten Tumorproben wurden entparaffiniert und es erfolgte die Extraktion der DNA. Der PIK3CA-Mutationsstatus der Tumorzellen wurde mittels Pyrosequenzierung bestimmt und der KRAS-Mutationsstatus mithilfe der Multiplex-Sequenzierung. Der Acetylsalicylsäure-Einnahmestatus sowie das 10-Jahres-Überleben wurden mit Hilfe von Patientenakten und Melderegistern ermittelt.

In dieser Arbeit lag eine Mutation im PIK3CA-Gen bei 16% und eine KRAS-Mutation bei 57% der Patienten vor. Die Einnahme von Acetylsalicylsäure erfolgte bei 34% der Patienten und das 10-Jahres-Gesamtüberleben betrug 44%. Es konnte gezeigt werden, dass Patienten mit PIK3CA-Wildtyp einen signifikanten Überlebensvorteil gegenüber Patienten mit PIK3CA-Mutation aufwiesen (Log-rank-Test: HR=0,59; 95% KI=0,29-0,96; p=0,04). Patienten mit regelmäßiger Einnahme von Acetylsalicylsäure zeigten im Gesamtkollektiv keine signifikant verbesserte absolute 10-Jahres-Überlebensrate im Vergleich zu Patienten ohne regelmäßige Einnahme von Acetylsalicylsäure (Log-rank-Test: HR=0,77; 95% KI=0,5-1,22; p=0,29). Unter allen Patienten mit regelmäßiger

Acetylsalicylsäure-Einnahme konnte für die Patienten mit PIK3CA-Wildtyp ein signifikanter Überlebensvorteil gegenüber Patienten mit PIK3CA-Mutation aufzeigt werden (Log-rank-Test: HR=0,33; 95% KI=0,05-0,62;  $p<0,01$ ). Dieser Überlebensvorteil zeigte sich unter den Patienten ohne Acetylsalicylsäure-Einnahme nicht (Log-rank-Test: HR=0,78; 95% KI=0,38-1,51;  $p=0,43$ ). Bei kombinierter Betrachtung des PIK3CA- und KRAS-Mutationsstatus zeigte sich unter den Patienten mit regelmäßiger Acetylsalicylsäure-Einnahme für Patienten mit PIK3CA-Wildtyp und KRAS-Mutation ein signifikanter Überlebensvorteil gegenüber Patienten mit anderen Kombinationen des Mutationsstatus (Log-rank-Test: HR=0,38; 95% KI=0,17-0,87;  $p=0,02$ ). Dieser Überlebensvorteil zeigte sich unter den Patienten ohne Acetylsalicylsäure-Einnahme nicht (Log-rank-Test: HR=0,95; 95% KI=0,58-1,57;  $p=0,84$ ). Für Patienten mit KRAS-Mutation, PIK3CA-Wildtyp und Acetylsalicylsäure-Einnahme zeigte sich ein Trend für einen Überlebensvorteil gegenüber Patienten mit KRAS-Mutation, PIK3CA-Wildtyp ohne Acetylsalicylsäure-Einnahme (Log-rank-Test: HR=0,57; 95% KI=0,30-1,08;  $p=0,09$ ).

Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen zusammenfassend vermuten, dass vor allem Patienten mit der Kombination von PIK3CA-Wildtyp und KRAS-Mutation von einer Acetylsalicylsäure-Einnahme nach Diagnosestellung des kolorektalen Karzinoms profitieren. Die Studienlage ist diesbezüglich sehr heterogen. In Studien von Liao et al. und Domingo et al. zeigte sich ein signifikant verbessertes Outcome für Patienten mit Mutation im PIK3CA-Gen gegenüber Patienten mit PIK3CA-Wildtyp bei Einnahme von Acetylsalicylsäure. In einer Studie von Reimers et al. zeigten Patienten mit regelmäßiger Acetylsalicylsäure-Einnahme und PIK3CA-Wildtyp ein signifikant längeres Gesamtüberleben gegenüber Patienten mit PIK3CA-Wildtyp ohne regelmäßige Einnahme. Aktuelle Studien von Murphy et al. und Kothari et al. konnten keinen signifikanten Zusammenhang zwischen dem PIK3CA-Mutationsstatus und einer Verlängerung des Gesamtüberlebens bei Einnahme von Acetylsalicylsäure feststellen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit unterstreichen zusammenfassend, dass für die Rollen des PIK3CA- und KRAS-Mutationsstatus als mögliche prädiktive Marker für eine „adjuvante“ Therapie mit Acetylsalicylsäure bei Patienten mit kolorektalem Karzinom prospektive Studien erforderlich sind. Aufgrund der aktuellen Studienlage und des nicht zu unterschätzenden Nebenwirkungsprofils von Acetylsalicylsäure sollte bei Patienten mit kolorektalem Karzinom eine „adjuvante“ Therapie mit Acetylsalicylsäure derzeit nur im Rahmen von Studien erfolgen.

## Summary

As more is known about the molecular properties that lead to the formation, growth, and metastasis of colorectal carcinoma, the greater gets the desire for individualized therapy for the individual patient. This requires molecular biomarkers that indicate whether a patient could benefit from a given therapy because of its tumor properties.

In various retrospective analyzes and meta-analyzes, a survival advantage was shown by an "adjuvant" intake of acetylsalicylic acid by patients with colorectal carcinoma. The PIK3CA mutation status was considered as a molecular biomarker for the response of acetylsalicylic acid therapy. The aim of this work was to examine whether the PIK3CA mutation status and the KRAS mutation status in patients with colorectal cancer represent suitable molecular biomarkers for "adjuvant" therapy with acetylsalicylic acid, as well as suitable prognostic markers for overall survival.

In this retrospective analysis, 153 patients with an initial diagnosis of colorectal cancer at the University Hospital Marburg in 2003/2004 were included. Paraffin-embedded tumor samples were deparaffinized and DNA extracted. The PIK3CA mutation status of tumor cells was determined by pyrosequencing and the KRAS mutation status by using multiplex sequencing. The acetylsalicylic acid intake status and the 10-year survival rate were assessed using patient records and reporting registers.

In this study, there was a mutation in the PIK3CA gene found in 16% and a KRAS mutation in 57% of the patients. Acetylsalicylic acid was taken by 34% of the patients and overall survival 10 years after the initial diagnosis was at 44%. It was shown that patients with PIK3CA wild-type had a significant survival advantage over patients with PIK3CA mutation (log-rank-test: HR=0.59; 95% CI=0.29-0.96; p=0.04). Patients with regular intake of acetylsalicylic acid did not show significantly improved absolute 10-year survival in the total population compared to patients without regular intake of acetylsalicylic acid (log-rank-test: HR=0.77; 95% CI=0.5-1.22; p=0.29). Among all patients with regular intake of acetylsalicylic acid, patients with PIK3CA wild-type were shown to have a significant survival advantage over patients with PIK3CA mutations (log-rank-test: HR=0.33; 95% CI=0.05-0.62; p<0.01). This survival advantage was not evident among the patients without acetylsalicylic acid intake (log-rank-test: HR=0.78; 95% CI=0.38-1.51; p=0.43). Reviewing the combined PIK3CA and KRAS mutation status

of patients with regular acetylsalicylic acid intake a significant survival benefit for patients with PIK3CA wild-type and KRAS mutation was observed compared to patients with other mutation status combinations (log-rank-test: HR=0.38; 95% CI=0.17-0.87; p=0.02). This survival advantage was not evident among the patients without acetylsalicylic acid intake (log-rank-test: HR=0.95; 95% CI=0.58-1.57; p=0.84). Patients with KRAS mutation, PIK3CA wild-type and acetylsalicylic acid ingestion showed a survival benefit over patients with KRAS mutation, PIK3CA wild-type without acetylsalicylic acid intake (log-rank-test: HR=0.57; 95% CI=0.30-1.08; p=0.09).

In summary, the results of this work suggest that patients with the combination of PIK3CA wild-type and KRAS mutation in particular benefit from acetylsalicylic acid intake after diagnosis of colorectal cancer. The study situation is very heterogeneous in this regard. Studies by Liao et al. and Domingo et al. showed a significantly improved outcome for patients with a mutation in the PIK3CA gene compared to patients with PIK3CA wildtype when taking acetylsalicylic acid. In a study by Reimers et al. Patients with regular acetylsalicylic acid intake and PIK3CA wild-type showed a significantly longer overall survival compared to patients with PIK3CA wild-type without regular intake. Recent studies by Murphy et al. and Kothari et al. found no significant association between the PIK3CA mutation status and an overall survival prolongation when taking acetylsalicylic acid.

The results of this study conclusively underline that the roles of the PIK3CA and KRAS mutation status as potential predictive markers for adjuvant therapy with acetylsalicylic acid in patients with colorectal cancer require prospective studies. Due to the current study situation and the not insignificant side effects profile of acetylsalicylic acid, in patients with colorectal carcinoma "adjuvant" therapy with acetylsalicylic acid should currently only be carried out as part of studies.

## Literaturverzeichnis

- Abnet, C. C.; Freedman, N. D.; Kamangar, F.; Leitzmann, M. F.; Hollenbeck, A. R.; Schatzkin, A. (2009): Non-steroidal anti-inflammatory drugs and risk of gastric and oesophageal adenocarcinomas: results from a cohort study and a meta-analysis. In: *Br. J. Cancer* 100 (3), S. 551–557.
- Abubaker, J.; Bavi, P.; Al-Harbi, S.; Ibrahim, M.; Siraj, A. K.; Al-Sanea, N.; Abduljabbar, A.; Ashari, L. H.; Alhomoud, S.; Al-Dayel, F.; Uddin, S.; Al-Kuraya, K. S. (2008): Clinicopathological analysis of colorectal cancers with PIK3CA mutations in Middle Eastern population. In: *Oncogene* 27 (25), S. 3539–3545.
- Alfonso, L.; Ai, G.; Spitale, R. C.; Bhat, G. J. (2014): Molecular targets of aspirin and cancer prevention. In: *Br. J. Cancer* 111 (1), S. 61–67.
- Ali, R.; Toh, H.-C.; Chia, W.-K. (2011): The utility of Aspirin in Dukes C and High Risk Dukes B Colorectal cancer--the ASCOLT study: study protocol for a randomized controlled trial. In: *Trials* 12, S. 261.
- Almoguera, C.; Shibata, D.; Forrester, K.; Martin, J.; Arnheim, N.; Perucho, M. (1988): Most human carcinomas of the exocrine pancreas contain mutant c-K-ras genes. In: *Cell* 53 (4), S. 549–554.
- Andreyev, H. J.; Norman, A. R.; Cunningham, D.; Oates, J. R.; Clarke, P. A. (1998): Kirsten ras mutations in patients with colorectal cancer: the multicenter "RASCAL" study. In: *Journal of the National Cancer Institute* 90 (9), S. 675–684.
- Arrington, A. K.; Heinrich, E. L.; Lee, W.; Duldulao, M.; Patel, S.; Sanchez, J.; Garcia-Aguilar, J.; Kim, J. (2012): Prognostic and predictive roles of KRAS mutation in colorectal cancer. In: *Int J Mol Sci* 13 (10), S. 12153–12168.
- Bader, A. G.; Kang, S.; Zhao, L.; Vogt, P. K. (2005): Oncogenic PI3K deregulates transcription and translation. In: *Nature Reviews Cancer* 5, 921 EP -.
- Bains, S. J.; Mahic, M.; Myklebust, T. A.; Smastuen, M. C.; Yaqub, S.; Dorum, L. M.; Bjornbeth, B. A.; Moller, B.; Brudvik, K. W.; Tasken, K. (2016): Aspirin As Secondary Prevention in Patients With Colorectal Cancer: An Unselected Population-Based Study. In: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 34 (21), S. 2501–2508.
- Bamford, S.; Dawson, E.; Forbes, S.; Clements, J.; Pettett, R.; Dogan, A.; Flanagan, A.; Teague, J.; Futreal, P. A.; Stratton, M. R.; Wooster, R. (2004): The COSMIC (Catalogue of Somatic Mutations in Cancer) database and website. In: *British journal of cancer* 91 (2), S. 355–358.
- Barault, L.; Veyrie, N.; Jooste, V.; Lecorre, D.; Chapusot, C.; Ferraz, J.-M.; Lièvre, A.; Cortet, M.; Bouvier, A.-M.; Rat, P.; Roignot, P.; Faivre, J.; Laurent-Puig, P.; Piard,

- F. (2008): Mutations in the RAS-MAPK, PI(3)K (phosphatidylinositol-3-OH kinase) signaling network correlate with poor survival in a population-based series of colon cancers. In: *Int. J. Cancer* 122 (10), S. 2255–2259.
- Belch, J.; MacCuish, A.; Campbell, I.; Cobbe, S.; Taylor, R.; Prescott, R.; Lee, R.; Bancroft, J.; MacEwan, S.; Shepherd, J.; Macfarlane, P.; Morris, A.; Jung, R.; Kelly, C.; Connacher, A.; Peden, N.; Jamieson, A.; Matthews, D.; Leese, G.; McKnight, J.; O'Brien, I.; Semple, C.; Petrie, J.; Gordon, D.; Pringle, S.; MacWalter, R. (2008): The prevention of progression of arterial disease and diabetes (POPADAD) trial: factorial randomised placebo controlled trial of aspirin and antioxidants in patients with diabetes and asymptomatic peripheral arterial disease. In: *BMJ (Clinical research ed.)* 337, S. 1840.
- Benvenuti, S.; Sartore-Bianchi, A.; Di Nicolantonio, F.; Zanon, C.; Moroni, M.; Veronese, S.; Siena, S.; Bardelli, A. (2007): Oncogenic activation of the RAS/RAF signaling pathway impairs the response of metastatic colorectal cancers to anti-epidermal growth factor receptor antibody therapies. In: *Cancer research* 67 (6), S. 2643–2648.
- Berg, M.; Danielsen, S. A.; Ahlquist, T.; Merok, M. A.; Agesen, T. H.; Vatn, M. H.; Mala, T.; Sjo, O. H.; Bakka, A.; Moberg, I.; Fetveit, T.; Mathisen, O.; Husby, A.; Sandvik, O.; Nesbakken, A.; Thiis-Evensen, E.; Lothe, R. A. (2010): DNA sequence profiles of the colorectal cancer critical gene set KRAS-BRAF-PIK3CA-PTEN-TP53 related to age at disease onset. In: *PloS one* 5 (11), S. 13978.
- Bishop, J.M. (1991): Molecular themes in oncogenesis. In: *Cell* 64 (2), S. 235–248.
- Boguski, M. S.; McCormick, F. (1993): Proteins regulating Ras and its relatives. In: *Nature* 366 (6456), S. 643–654.
- Bokemeyer, C.; Bondarenko, I.; Makhson, A.; Hartmann, J. T.; Aparicio, J.; Braud, F. de; Donea, S.; Ludwig, H.; Schuch, G.; Stroh, C.; Loos, A. H.; Zubel, A.; Koralewski, P. (2009): Fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin with and without cetuximab in the first-line treatment of metastatic colorectal cancer. In: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 27 (5), S. 663–671.
- Bos, J. L.; Fearon, E. R.; Hamilton, S. R.; Verlaan-de Vries, M.; van Boom, J. H.; van der Eb, A. J.; Vogelstein, B. (1987): Prevalence of ras gene mutations in human colorectal cancers. In: *Nature* 327 (6120), S. 293–297.
- Bourne, H. R.; Sanders, D. A.; McCormick, F. (1990): The GTPase superfamily: a conserved switch for diverse cell functions. In: *Nature* 348 (6297), S. 125–132.
- Bourne, H. R.; Sanders, D. A.; McCormick, F. (1991): The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. In: *Nature* 349 (6305), S. 117–127.
- Bowman, L.; Mafham, M.; Wallendszus, K.; Stevens, W.; Buck, G.; Barton, J.; Murphy, K.; Aung, T.; Haynes, R.; Cox, J.; Murawska, A.; Young, A.; Lay, M.; Chen, F.;

- Sammons, E.; Waters, E.; Adler, A.; Bodansky, J.; Farmer, A.; McPherson, R.; Neil, A.; Simpson, D.; Peto, R.; Baigent, C.; Collins, R.; Parish, S.; Armitage, J. (2018): Effects of Aspirin for Primary Prevention in Persons with Diabetes Mellitus. In: *N. Engl. J. Med.* 379 (16), S. 1529–1539.
- Brazil, D. P.; Hemmings, B. A. (2001): Ten years of protein kinase B signalling. A hard Akt to follow. In: *Trends in Biochemical Sciences* 26 (11), S. 657–664.
- Breivik, J.; Meling, G. I.; Spurkland, A.; Rognum, T. O.; Gaudernack, G. (1994): K-ras mutation in colorectal cancer: relations to patient age, sex and tumour location. In: *British journal of cancer* 69 (2), S. 367–371.
- Brink, M.; Goeij, A. F. P. M. de; Weijenberg, M. P.; Roemen, G. M. J. M.; Lentjes, M. H. F. M.; Pachen, M. M. M.; Smits, K. M.; Bruine, A. P. de; Goldbohm, R. A.; van den Brandt, P. A. (2003): K-ras oncogene mutations in sporadic colorectal cancer in The Netherlands Cohort Study. In: *Carcinogenesis* 24 (4), S. 703–710.
- Brody, H. (2015): Colorectal cancer. In: *Nature* 521 (7551), S1.
- Buchanan, F. G.; Wang, D.; Bargiacchi, F.; DuBois, R. N. (2003): Prostaglandin E2 regulates cell migration via the intracellular activation of the epidermal growth factor receptor. In: *The Journal of Biological Chemistry* 278 (37), S. 35451–35457.
- Burn, J.; Gerdes, A.-M.; Macrae, F.; Mecklin, J.-P.; Moeslein, G.; Olschwang, S.; Eccles, D.; Evans, D. G.; Maher, E. R.; Bertario, L.; Bisgaard, M.-L.; Dunlop, M. G.; Ho, J. W. C.; Hodgson, S. V.; Lindblom, A.; Lubinski, J.; Morrison, P. J.; Murday, V.; Ramesar, R.; Side, L.; Scott, R. J.; Thomas, H. J. W.; Vasen, H. F.; Barker, G.; Crawford, G.; Elliott, F.; Movahedi, M.; Pylvanainen, K.; Wijnen, J. T.; Fodde, R.; Lynch, H. T.; Mathers, J. C.; Bishop, D. T. (2011): Long-term effect of aspirin on cancer risk in carriers of hereditary colorectal cancer: an analysis from the CAPP2 randomised controlled trial. In: *Lancet (London, England)* 378 (9809), S. 2081–2087.
- Burt, R. W.; DiSario, J. A.; Cannon-Albright, L. (1995): Genetics of colon cancer: impact of inheritance on colon cancer risk. In: *Annual review of medicine* 46, S. 371–379.
- Calistri, D.; Rengucci, C.; Seymour, I.; Lattuneddu, A.; Polifemo, A. M.; Monti, F.; Saragoni, L.; Amadori, D. (2005): Mutation analysis of p53, K-ras, and BRAF genes in colorectal cancer progression. In: *Journal of cellular physiology* 204 (2), S. 484–488.
- Cantley, L. C. (2002): The phosphoinositide 3-kinase pathway. In: *Science* 296 (5573), S. 1655–1657.
- Castellone, M. D.; Teramoto, H.; Williams, B. O.; Druey, K. M.; Gutkind, J. S. (2005): Prostaglandin E2 promotes colon cancer cell growth through a Gs-axin-beta-catenin signaling axis. In: *Science* 310 (5753), S. 1504–1510.

- Chan A. T.; Giovannucci E. L.; Meyerhardt J. A.; Schernhammer E. S.; Curhan G. C.; Fuchs C. S. (2005): Long-term use of aspirin and nonsteroidal anti-inflammatory drugs and risk of colorectal cancer. In: *JAMA* 294 (8), S. 914–923
- Chan, A. T.; Ogino, S.; Fuchs, C. S. (2007): Aspirin and the risk of colorectal cancer in relation to the expression of COX-2. In: *N. Engl. J. Med.* 356 (21), S. 2131–2142.
- Chan, A. T.; Ogino, S.; Fuchs, C. S. (2009): Aspirin use and survival after diagnosis of colorectal cancer. In: *JAMA* 302 (6), S. 649–658.
- Chan, A. T.; Ogino, S.; Giovannucci, E. L.; Fuchs, C. S. (2011): Inflammatory markers are associated with risk of colorectal cancer and chemopreventive response to anti-inflammatory drugs. In: *Gastroenterology* 140 (3), 799–808.
- Chubak, J.; Whitlock, E. P.; Williams, S. B.; Kamineni, A.; Burda, B. U.; Buist, D. S. M.; Anderson, M. L. (2016): Aspirin for the Prevention of Cancer Incidence and Mortality: Systematic Evidence Reviews for the U.S. Preventive Services Task Force. In: *Annals of internal medicine* 164 (12), S. 814–825.
- Coghill, A. E.; Newcomb, P. A.; Campbell, P. T.; Burnett-Hartman, A. N.; Adams, S. V.; Poole, E. M.; Potter, J. D.; Ulrich, C. M. (2011): Prediagnostic non-steroidal anti-inflammatory drug use and survival after diagnosis of colorectal cancer. In: *Gut* 60 (4), S. 491–498.
- Cooper, K.; Squires, H.; Carroll, C.; Papaioannou, D.; Booth, A.; Logan, R. F.; Maguire, C.; Hind, D.; Tappenden, P. (2010): Chemoprevention of colorectal cancer: systematic review and economic evaluation. In: *Health Technol Assess* 14 (32), S. 1–206.
- Coyle, C.; Cafferty, F. H.; Rowley, S.; MacKenzie, M.; Berkman, L.; Gupta, S.; Pramesh, C. S.; Gilbert, D.; Kynaston, H.; Cameron, D.; Wilson, R. H.; Ring, A.; Langley, R. E. (2016): ADD-ASPIRIN: A phase III, double-blind, placebo controlled, randomised trial assessing the effects of aspirin on disease recurrence and survival after primary therapy in common non-metastatic solid tumours. In: *Contemporary clinical trials* 51, S. 56–64.
- Cross, D. A.; Alessi, D. R.; Cohen, P.; Andjelkovich, M.; Hemmings, B. A. (1995): Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. In: *Nature* 378 (6559), S. 785–789.
- Cuzick, J.; Otto, F.; Baron, J. A.; Brown, P. H.; Burn, J.; Greenwald, P.; Jankowski, J.; La Vecchia, C.; Meyskens, F.; Senn, H. J.; Thun, M. (2009): Aspirin and non-steroidal anti-inflammatory drugs for cancer prevention: an international consensus statement. In: *The Lancet Oncology* 10 (5), S. 501–507.
- Di Popolo, A.; Memoli, A.; Apicella, A.; Tuccillo, C.; Di Palma, A.; Ricchi, P.; Acquaviva, A. M.; Zarrilli, R. (2000): IGF-II/IGF-I receptor pathway up-regulates COX-2 mRNA expression and PGE2 synthesis in Caco-2 human colon carcinoma cells. In: *Oncogene* 19 (48), S. 5517–5524.



- Domin, J.; Waterfield, M. D. (1997): Using structure to define the function of phosphoinositide 3-kinase family members. In: *FEBS Letters* 410 (1), S. 91–95.
- Domingo, E.; Church, D. N.; Sieber, O.; Ramamoorthy, R.; Yanagisawa, Y.; Johnstone, E.; Davidson, B.; Kerr, D. J.; Tomlinson, I. P. M.; Midgley, R. (2013): Evaluation of PIK3CA mutation as a predictor of benefit from nonsteroidal anti-inflammatory drug therapy in colorectal cancer. In: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 31 (34), S. 4297–4305.
- Dube, S.; Heyen, F.; Jenicek, M. (1997): Adjuvant chemotherapy in colorectal carcinoma: results of a meta-analysis. In: *Diseases of the colon and rectum* 40 (1), S. 35–41.
- Eberhart C. E.; Coffey R. J.; Radhika A.; Giardiello F. M.; Ferrenbach S.; DuBois R. N. (1994): Up-regulation of cyclooxygenase 2 gene expression in human colorectal adenomas and adenocarcinomas. In: *Gastroenterology* (107(4)), S. 1183–1188.
- Engelman, J. A.; Luo, J.; Cantley, L. C. (2006): The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. In: *Nat. Rev. Genet.* 7 (8), S. 606–619.
- Fearon, E. R.; Vogelstein, B. (1990): A genetic model for colorectal tumorigenesis. In: *Cell* 61 (5), S. 759–767.
- Fedirko, V.; Tramacere, I.; Bagnardi, V.; Rota, M.; Scotti, L.; Islami, F.; Negri, E.; Straif, K.; Romieu, I.; La Vecchia, C.; Boffetta, P.; Jenab, M. (2011): Alcohol drinking and colorectal cancer risk: an overall and dose-response meta-analysis of published studies. In: *Ann. Oncol.* 22 (9), S. 1958–1972.
- Ferrández, A.; Piazzuelo, E.; Castells, A. (2012): Aspirin and the prevention of colorectal cancer. In: *Best practice & research. Clinical gastroenterology* 26 (2), S. 185–195.
- Finkelstein, S. D.; Sayegh, R.; Bakker, A.; Swalsky, P. (1993): Determination of tumor aggressiveness in colorectal cancer by K-ras-2 analysis. In: *Archives of surgery (Chicago, Ill. : 1960)* 128 (5), S. 526–531.
- Forbes, S. A.; Beare, D.; Boutselakis, H.; Bamford, S.; Bindal, N.; Tate, J.; Cole, C. G.; Ward, S.; Dawson, E.; Ponting, L.; Stefancsik, R.; Harsha, B.; Kok, C. Y.; Jia, M.; Jubb, H.; Sondka, Z.; Thompson, S.; De, T.; Campbell, P. J. (2017): COSMIC: somatic cancer genetics at high-resolution. In: *Nucleic acids research* 45 (D1), S. 777–783.
- Fowkes, F. G. R.; Price, J. F.; Stewart, M. C. W.; Butcher, I.; Leng, G. C.; Pell, A. C. H.; Sandercock, P. A. G.; Fox, K. A. A.; Lowe, G. D. O.; Murray, G. D. (2010): Aspirin for prevention of cardiovascular events in a general population screened for a low ankle brachial index: a randomized controlled trial. In: *JAMA* 303 (9), S. 841–848.
- Francini, G.; Petrioli, R.; Lorenzini, L.; Mancini, S.; Armenio, S.; Tanzini, G.; Marsili, S.; Aquino, A.; Marzocca, G.; Civitelli, S. (1994): Folinic acid and 5-fluorouracil as adjuvant chemotherapy in colon cancer. In: *Gastroenterology* 106 (4), S. 899–906.

- Franke, T. F.; Yang, S. I.; Chan, T. O.; Datta, K.; Kazlauskas, A.; Morrison, D. K.; Kaplan, D. R.; Tsichlis, P. N. (1995): The protein kinase encoded by the Akt proto-oncogene is a target of the PDGF-activated phosphatidylinositol 3-kinase. In: *Cell* 81 (5), S. 727–736.
- Frouws, M. A.; Rademaker, E.; Bastiaannet, E.; van Herk-Sukel, M. P. P.; Lemmens, V. E.; van de Velde, C. J. H.; Portielje, J. E. A.; Liefers, G. J. (2017): The difference in association between aspirin use and other thrombocyte aggregation inhibitors and survival in patients with colorectal cancer. In: *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)* 77, S. 24–30.
- Frouws, M. A.; Reimers, M. S.; Swets, M.; Bastiaannet, E.; Prinse, B.; van Eijk, R.; Lemmens, V. E. P. P.; van Herk-Sukel, M. P. P.; van Wezel, T.; Kuppen, P. J. K.; Morreau, H.; van de Velde, C. J. H.; Liefers, G.-J. (2017): The Influence of BRAF and KRAS Mutation Status on the Association between Aspirin Use and Survival after Colon Cancer Diagnosis. In: *PloS one* 12 (1), e0170775. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170775>
- Fujino, H.; Seira, N.; Kurata, N.; Araki, Y.; Nakamura, H.; Regan, J. W.; Murayama, T. (2015): Prostaglandin E2-stimulated prostanoid EP4 receptors induce prolonged de novo prostaglandin E2 synthesis through biphasic phosphorylation of extracellular signal-regulated kinases mediated by activation of protein kinase A in HCA-7 human colon cancer cells. In: *European journal of pharmacology* 768, S. 149–159.
- Funk, C. D. (2001): Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. In: *Science* 294 (5548), S. 1871–1875.
- Gao, M.; Guo, K.-M.; Wei, Y.-M.; Ma, M.-M.; Cai, J.-R.; Xia, T.-T.; Ye, Q.-J. (2017): Aspirin inhibits the proliferation of human uterine leiomyoma cells by downregulation of K-Ras-p110 $\alpha$  interaction. In: *Oncology reports* 38 (4), S. 2507–2517.
- Garavito, R.M.; DeWitt, D. L. (1999): The cyclooxygenase isoforms: structural insights into the conversion of arachidonic acid to prostaglandins. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1441 (2-3), S. 278–287.
- García Rodríguez, L. A.; Soriano-Gabarró, M.; Bromley, S.; Lanás, A.; Cea Soriano, L. (2017): New use of low-dose aspirin and risk of colorectal cancer by stage at diagnosis: a nested case-control study in UK general practice. In: *BMC cancer* 17 (1), S. 637.
- Gay, L. J.; Felding-Habermann, B. (2011): Contribution of platelets to tumour metastasis. In: *Nature Reviews Cancer* 11, 123 EP -.
- Gaziano, J. M.; Brotons, C.; Coppolecchia, R.; Cricelli, C.; Darius, H.; Gorelick, P. B.; Howard, G.; Pearson, T. A.; Rothwell, P. M.; Ruilope, L. M.; Tendera, M.; Tognoni, G. (2018): Use of aspirin to reduce risk of initial vascular events in patients at

- moderate risk of cardiovascular disease (ARRIVE): a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. In: *Lancet (London, England)* 392 (10152), S. 1036–1046.
- Goffin, J. R.; Zbuk, K. (2013): Epidermal growth factor receptor: pathway, therapies, and pipeline. In: *Clinical therapeutics* 35 (9), S. 1282–1303.
- Goh, C. H.; Goh, H. H.; Leong, W. Q.; Chew, M. H.; Pan, Y. S.; Tony, L. K. H.; Chew, L.; Tan, I. B. H.; Toh, H. C.; Tang, C. L.; Fu, W. P. C.; Chia, W. K. (2014): Post-operative aspirin use and colorectal cancer-specific survival in patients with stage I-III colorectal cancer. In: *Anticancer research* 34 (12), S. 7407–7414.
- Gray, R. T.; Cantwell, M. M.; Coleman, H. G.; Loughrey, M. B.; Bankhead, P.; McQuaid, S.; O'Neill, R. F.; Arthur, K.; Bingham, V.; McGready, C.; Gavin, A. T.; Cardwell, C. R.; Johnston, B. T.; James, J. A.; Hamilton, P. W.; Salto-Tellez, M.; Murray, L. J. (2017): Evaluation of PTGS2 Expression, PIK3CA Mutation, Aspirin Use and Colon Cancer Survival in a Population-Based Cohort Study. In: *Clinical and translational gastroenterology* 8 (4), e91. DOI: 10.1016/j.ejca.2019.01.022.
- Harris, T. E.; Lawrence, J. C. (2003): TOR signaling. In: *Sci. STKE* 2003 (212), re15.
- Hennekens, C. H.; Schneider, W. R. (2008): The need for wider and appropriate utilization of aspirin and statins in the treatment and prevention of cardiovascular disease. In: *Expert Rev Cardiovasc Ther* 6 (1), S. 95–107.
- Hua, X.; Phipps, A. I.; Burnett-Hartman, A. N.; Adams, S. V.; Hardikar, S.; Cohen, S. A.; Kocarnik, J. M.; Ahnen, D. J.; Lindor, N. M.; Baron, J. A.; Newcomb, P. A. (2017): Timing of Aspirin and Other Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drug Use Among Patients With Colorectal Cancer in Relation to Tumor Markers and Survival. In: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 35 (24), S. 2806–2813.
- Humblet, Y. (2004): Cetuximab: an IgG(1) monoclonal antibody for the treatment of epidermal growth factor receptor-expressing tumours. In: *Expert opinion on pharmacotherapy* 5 (7), S. 1621–1633.
- Hurwitz, H. I.; Yi, J.; Ince, W.; Novotny, W. F.; Rosen, O. (2009): The clinical benefit of bevacizumab in metastatic colorectal cancer is independent of K-ras mutation status: analysis of a phase III study of bevacizumab with chemotherapy in previously untreated metastatic colorectal cancer. In: *The oncologist* 14 (1), S. 22–28.
- Ikeda, Y.; Shimada, K.; Teramoto, T.; Uchiyama, S.; Yamazaki, T.; Oikawa, S.; Sugawara, M.; Ando, K.; Murata, M.; Yokoyama, K.; Ishizuka, N. (2014): Low-dose aspirin for primary prevention of cardiovascular events in Japanese patients 60 years or older with atherosclerotic risk factors: a randomized clinical trial. In: *JAMA* 312 (23), S. 2510–2520.

- Ikenoue, T.; Kanai, F.; Hikiba, Y.; Obata, T.; Tanaka, Y.; Imamura, J.; Ohta, M.; Jazag, A.; Guleng, B.; Tateishi, K.; Asaoka, Y.; Matsumura, M.; Kawabe, T.; Omata, M. (2005): Functional analysis of PIK3CA gene mutations in human colorectal cancer. In: *Cancer Res.* 65 (11), S. 4562–4567.
- Ince, W. L.; Jubb, A. M.; Holden, S. N.; Holmgren, E. B.; Tobin, P.; Sridhar, M.; Hurwitz, H. I.; Kabbinavar, F.; Novotny, W. F.; Hillan, K. J.; Koeppen, H. (2005): Association of k-ras, b-raf, and p53 status with the treatment effect of bevacizumab. In: *J. Natl. Cancer Inst.* 97 (13), S. 981–989.
- Ittaman, S. V.; VanWormer, J. J.; Rezkalla, S. H. (2014): The role of aspirin in the prevention of cardiovascular disease. In: *Clinical medicine & research* 12 (3-4), S. 147–154.
- Jacobs, E. J.; Rodriguez, C.; Mondul, A. M.; Connell, C. J.; Henley, S. J.; Calle, E. E.; Thun, M. J. (2005): A large cohort study of aspirin and other nonsteroidal anti-inflammatory drugs and prostate cancer incidence. In: *J. Natl. Cancer Inst.* 97 (13), S. 975–980.
- Jang, S.; Hong, M.; Shin, M. K.; Kim, B. C.; Shin, H.-S.; Yu, E.; Hong, S.-M.; Kim, J.; Chun, S.-M.; Kim, T.-I.; Choi, K.-C.; Ko, Y. W.; Kim, J. W. (2017): KRAS and PIK3CA mutations in colorectal adenocarcinomas correlate with aggressive histological features and behavior. In: *Human pathology* 65, S. 21–30.
- Jess, T.; Rungoe, C.; Peyrin-Biroulet, L. (2012): Risk of colorectal cancer in patients with ulcerative colitis: a meta-analysis of population-based cohort studies. In: *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association* 10 (6), S. 639–645.
- Jinghua Yu, Yitao Zhang, James McIlroy, Tamara Rordorf-Nikolic, George A. Orr and Jonathan M. Backer\* (1998): Regulation of the p85/p110 Phosphatidylinositol 3'-Kinase: Stabilization and Inhibition of the p110 $\alpha$  Catalytic Subunit by the p85 Regulatory Subunit. In: *Mol. Cell. Biol.* (18), S. 1379–1387.
- Kampman, E. (2000): Animal products and K-ras codon 12 and 13 mutations in colon carcinomas. In: *Carcinogenesis* 21 (2), S. 307–309.
- Kang, S.; Bader, A. G.; Vogt, P. K. (2005): Phosphatidylinositol 3-kinase mutations identified in human cancer are oncogenic. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102 (3), S. 802–807.
- Kanth, P.; Grimmett, J.; Champine, M.; Burt, R.; Samadder, N. J. (2017): Hereditary Colorectal Polyposis and Cancer Syndromes: A Primer on Diagnosis and Management. In: *The American journal of gastroenterology* 112, S. 1509.
- Kato, S.; Iida, S.; Higuchi, T.; Ishikawa, T.; Takagi, Y.; Yasuno, M.; Enomoto, M.; Uetake, H.; Sugihara, K. (2007): PIK3CA mutation is predictive of poor survival in patients with colorectal cancer. In: *International journal of cancer* 121 (8), S. 1771–1778.

- Kim, S.-E.; Paik, H. Y.; Yoon, H.; Lee, J. E.; Kim, N.; Sung, M.-K. (2015): Sex- and gender-specific disparities in colorectal cancer risk. In: *World journal of gastroenterology* 21 (17), S. 5167–5175.
- Kodaki, T.; Woscholski, R.; Hallberg, B.; Rodriguez-Viciano J. D., P.; Parker, P. J. (1994): The activation of phosphatidylinositol 3-kinase by Ras. In: *Current Biology* 4 (9), S. 798–806.
- Kothari, N.; Kim, R.; Jorissen, R. N.; Desai, J.; Tie, J.; Wong, H.-L.; Faragher, I.; Jones, I.; Day, F. L.; Li, S.; Sakthinandeswaren, A.; Palmieri, M.; Lipton, L.; Schell, M.; Teer, J. K.; Shibata, D.; Yeatman, T.; Sieber, O. M.; Gibbs, P.; Tran, B. (2015): Impact of regular aspirin use on overall and cancer-specific survival in patients with colorectal cancer harboring a PIK3CA mutation. In: *Acta oncologica (Stockholm, Sweden)* 54 (4), S. 487–492.
- Kranenburg, O. (2005): The KRAS oncogene: past, present, and future. In: *Biochimica et biophysica acta* 1756 (2), S. 81–82.
- Lee, J. W.; Soung, Y. H.; Kim, S. Y.; Lee, H. W.; Park, W. S.; Nam, S. W.; Kim, S. H.; Lee, J. Y.; Yoo, N. J.; Lee, S. H. (2005): PIK3CA gene is frequently mutated in breast carcinomas and hepatocellular carcinomas. In: *Oncogene* 24 (8), S. 1477–1480.
- Lee, M. S.; Menter, D. G.; Kopetz, S. (2017): Right Versus Left Colon Cancer Biology: Integrating the Consensus Molecular Subtypes. In: *Journal of the National Comprehensive Cancer Network* 15 (3), S. 411–419.
- Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom, Kurzversion 2.1, 2019, AWMF Registrierungsnummer: 021/007OL, <http://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/kolorektales-karzinom/> [abgerufen am: 23.11.2019]
- Leone, V.; Di Palma, A.; Ricchi, P.; Acquaviva, F.; Giannouli, M.; Di Prisco, A. M.; Iuliano, F.; Acquaviva, A. M. (2007): PGE2 inhibits apoptosis in human adenocarcinoma Caco-2 cell line through Ras-PI3K association and cAMP-dependent kinase A activation. In: *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* 293 (4), S. 673–681.
- Li, L.; Ni, B.-B.; Zhong, Q.-H.; Liu, Y.-H.; Zhang, M.-H.; Zhang, K.-P.; Chen, D.-C.; Wang, L. (2017): Investigation of correlation between mutational status in key EGFR signaling genes and prognosis of stage II colorectal cancer. In: *Future oncology (London, England)* 13 (17), S. 1473–1492.
- Li, P.; Wu, H.; Zhang, H.; Shi, Y.; Xu, J.; Ye, Y.; Xia, D.; Yang, J.; Cai, J.; Wu, Y. (2015): Aspirin use after diagnosis but not prediagnosis improves established colorectal cancer survival: a meta-analysis. In: *Gut* 64 (9), S. 1419–1425.

- Liang, P. S.; Chen, T.-Y.; Giovannucci, E. (2009): Cigarette smoking and colorectal cancer incidence and mortality: systematic review and meta-analysis. In: *Int. J. Cancer* 124 (10), S. 2406–2415.
- Liao, X.; Lochhead, P.; Nishihara, R.; Morikawa, T.; Kuchiba, A.; Yamauchi, M.; Imamura, Y.; Qian, Z. R.; Baba, Y.; Shima, K.; Sun, R.; Nosho, K.; Meyerhardt, J. A.; Giovannucci, E.; Fuchs, C. S.; Chan, A. T.; Ogino, S. (2012): Aspirin use, tumor PIK3CA mutation, and colorectal-cancer survival. In: *N. Engl. J. Med.* 367 (17), S. 1596–1606.
- Liao, X.; Morikawa, T.; Lochhead, P.; Imamura, Y.; Kuchiba, A.; Yamauchi, M.; Nosho, K.; Qian, Z. R.; Nishihara, R.; Meyerhardt, J. A.; Fuchs, C. S.; Ogino, S. (2012): Prognostic role of PIK3CA mutation in colorectal cancer: cohort study and literature review. In: *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 18 (8), S. 2257–2268.
- Lièvre, A.; Bachet, J.-B.; Le Corre, D.; Boige, V.; Landi, B.; Emile, J.-F.; Côté, J.-F.; Tomasic, G.; Penna, C.; Ducreux, M.; Rougier, P.; Penault-Llorca, F.; Laurent-Puig, P. (2006): KRAS mutation status is predictive of response to cetuximab therapy in colorectal cancer. In: *Cancer Res.* 66 (8), S. 3992–3995.
- Ma, Y.; Yang, Y.; Wang, F.; Zhang, P.; Shi, C.; Zou, Y.; Qin, H. (2013): Obesity and risk of colorectal cancer: a systematic review of prospective studies. In: *PloS one* 8 (1), e53916. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0053916>.
- Marshall, P. J.; Kulmacz, R. J. (1988): Prostaglandin H synthase: Distinct binding sites for cyclooxygenase and peroxidase substrates. In: *Archives of Biochemistry and Biophysics* 266 (1), S. 162–170.
- Mayo, L. D.; Donner, D. B. (2001): A phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway promotes translocation of Mdm2 from the cytoplasm to the nucleus. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98 (20), S. 11598–11603.
- McCowan, C.; Munro, A. J.; Donnan, P. T.; Steele, R. J. C. (2013): Use of aspirin post-diagnosis in a cohort of patients with colorectal cancer and its association with all-cause and colorectal cancer specific mortality. In: *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)* 49 (5), S. 1049–1057.
- McCubrey, J. A.; Steelman, L. S.; Abrams, S. L.; Lee, J. T.; Chang, F.; Bertrand, F. E.; Navolanic, P. M.; Terrian, D. M.; Franklin, R. A.; D'Assoro, A. B.; Salisbury, J. L.; Mazarino, M. C.; Stivala, F.; Libra, M. (2006): Roles of the RAF/MEK/ERK and PI3K/PTEN/AKT pathways in malignant transformation and drug resistance. In: *Advances in enzyme regulation* 46, S. 249–279.
- McNeil, J. J.; Wolfe, R.; Woods, R. L.; Tonkin, A. M.; Donnan, G. A.; Nelson, M. R.; Reid, C. M.; Lockery, J. E.; Kirpach, B.; Storey, E.; Shah, R. C.; Williamson, J. D.; Margolis, K. L.; Ernst, M. E.; Abhayaratna, W. P.; Stocks, N.; Fitzgerald, S. M.; Orchard, S. G.;

- Trevaks, R. E.; Beilin, L. J.; Johnston, C. I.; Ryan, J.; Radziszewska, B.; Jelinek, M.; Malik, M.; Eaton, C. B.; Brauer, D.; Cloud, G.; Wood, E. M.; Mahady, S. E.; Satterfield, S.; Grimm, R.; Murray, A. M. (2018): Effect of Aspirin on Cardiovascular Events and Bleeding in the Healthy Elderly. In: *N. Engl. J. Med.* 379 (16), S. 1509–1518.
- Mei, Z. B.; Duan, C. Y.; Li, C. B.; Cui, L.; Ogino, S. (2016): Prognostic role of tumor PIK3CA mutation in colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. In: *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology* 27 (10), S. 1836–1848.
- Mitin, N.; Rossman, K. L.; Der, C. J. (2005): Signaling interplay in Ras superfamily function. In: *Current biology : CB* 15 (14), S. 563–674.
- Murphy, C.; Turner, N.; Wong, H.-L.; Sinnathamby, M.; Tie, J.; Lee, B.; Desai, J.; Skinner, I.; Christie, M.; Hutchinson, R.; Lunke, S.; Waring, P.; Gibbs, P.; Tran, B. (2017): Examining the impact of regular aspirin use and PIK3CA mutations on survival in stage 2 colon cancer. In: *Internal medicine journal* 47 (1), S. 88–98.
- Ng, K.; Meyerhardt, J. A.; Chan, A. T.; Sato, K.; Chan, J. A.; Niedzwiecki, D.; Saltz, L. B.; Mayer, R. J.; Benson, A. B.; Schaefer, P. L.; Whittom, R.; Hantel, A.; Goldberg, R. M.; Venook, A. P.; Ogino, S.; Giovannucci, E. L.; Fuchs, C. S. (2015): Aspirin and COX-2 inhibitor use in patients with stage III colon cancer. In: *J. Natl. Cancer Inst.* 107 (1), S. 345.
- Nosho, K.; Kawasaki, T.; Ohnishi, M.; Suemoto, Y.; Kirkner, G. J.; Zepf, D.; Yan, L.; Longtine, J. A.; Fuchs, C. S.; Ogino, S. (2008): PIK3CA mutation in colorectal cancer: relationship with genetic and epigenetic alterations. In: *Neoplasia (New York, N.Y.)* 10 (6), S. 534–541.
- O'Connell, M. J.; Mailliard, J. A.; Kahn, M. J.; Macdonald, J. S.; Haller, D. G.; Mayer, R. J.; Wieand, H. S. (1997): Controlled trial of fluorouracil and low-dose leucovorin given for 6 months as postoperative adjuvant therapy for colon cancer. In: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 15 (1), S. 246–250.
- Ogawa, H.; Nakayama, M.; Morimoto, T.; Uemura, S.; Kanauchi, M.; Doi, N.; Jinnouchi, H.; Sugiyama, S.; Saito, Y. (2008): Low-dose aspirin for primary prevention of atherosclerotic events in patients with type 2 diabetes: a randomized controlled trial. In: *JAMA* 300 (18), S. 2134–2141.
- Ogino, S.; Nosho, K.; Kirkner, G. J.; Shima, K.; Irahara, N.; Kure, S.; Chan, A. T.; Engelman, J. A.; Kraft, P.; Cantley, L. C.; Giovannucci, E. L.; Fuchs, C. S. (2009): PIK3CA mutation is associated with poor prognosis among patients with curatively resected colon cancer. In: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 27 (9), S. 1477–1484.

- Pai, R.; Soreghan, B.; Szabo, I. L.; Pavelka, M.; Baatar, D.; Tarnawski, A. S. (2002): Prostaglandin E2 transactivates EGF receptor: a novel mechanism for promoting colon cancer growth and gastrointestinal hypertrophy. In: *Nature medicine* 8 (3), S. 289–293.
- Palomba, G.; Doneddu, V.; Cossu, A.; Paliogiannis, P.; Manca, A.; Casula, M.; Colombino, M.; Lanzillo, A.; Defraia, E.; Pazzola, A.; Sanna, G.; Putzu, C.; Ortu, S.; Scartozzi, M.; Ionta, M. T.; Baldino, G.; Sarobba, G.; Capelli, F.; Sedda, T.; Viridis, L.; Barca, M.; Gramignano, G.; Budroni, M.; Tanda, F.; Palmieri, G. (2016): Prognostic impact of KRAS, NRAS, BRAF, and PIK3CA mutations in primary colorectal carcinomas: a population-based study. In: *Journal of translational medicine* 14 (1), S. 292.
- Perrone, F.; Lampis, A.; Orsenigo, M.; Di Bartolomeo, M.; Gevorgyan, A.; Losa, M.; Frattini, M.; Riva, C.; Andreola, S.; Bajetta, E.; Bertario, L.; Leo, E.; Pierotti, M. A.; Pilotti, S. (2009): PI3KCA/PTEN deregulation contributes to impaired responses to cetuximab in metastatic colorectal cancer patients. In: *Ann. Oncol.* 20 (1), S. 84–90.
- Peto, R.; Gray, R.; Collins, R.; Wheatley, K.; Hennekens, C.; Jamrozik, K.; Warlow, C.; Hafner, B.; Thompson, E.; Norton, S.; Gilliland, J.; Doll, R. (1988): Randomised trial of prophylactic daily aspirin in British male doctors. In: *BMJ (Clinical research ed.)* 296 (6618), S. 313–316.
- Petrosino, J. F.; Highlander, S.; Luna, R. A.; Gibbs, R. A.; Versalovic, J. (2009): Metagenomic pyrosequencing and microbial identification. In: *Clinical chemistry* 55 (5), S. 856–866.
- Prenen, H.; Schutter, J. de; Jacobs, B.; Roock, W. de; Biesmans, B.; Claes, B.; Lambrechts, D.; van Cutsem, E.; Tejpar, S. (2009): PIK3CA mutations are not a major determinant of resistance to the epidermal growth factor receptor inhibitor cetuximab in metastatic colorectal cancer. In: *Clin. Cancer Res.* 15 (9), S. 3184–3188.
- Rasool, S.; Kadla, S. A.; Rasool, V.; Ganai, B. A. (2013): A comparative overview of general risk factors associated with the incidence of colorectal cancer. In: *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* 34 (5), S. 2469–2476.
- Reggiani Bonetti, L.; Barresi, V.; Maiorana, A.; Manfredini, S.; Caprera, C.; Bettelli, S. (2018): Clinical Impact and Prognostic Role of KRAS/BRAF/PIK3CA Mutations in Stage I Colorectal Cancer. In: *Disease markers* 2018, S. 2959801.
- Reimers, M. S.; Bastiaannet, E.; Langley, R. E.; van Eijk, R.; van Vlierberghe, R. L. P.; Lemmens, V. E. P.; van Herk-Sukel, M. P. P.; van Wezel, T.; Fodde, R.; Kuppen, P. J. K.; Morreau, H.; van de Velde, C. J. H.; Liefers, G. J. (2014): Expression of HLA class I antigen, aspirin use, and survival after a diagnosis of colon cancer. In: *JAMA internal medicine* 174 (5), S. 732–739.



- Ridker, P. M.; Cook, N. R.; Lee, I.-M.; Gordon, D.; Gaziano, J. M.; Manson, J. E.; Hennekens, C. H.; Buring, J. E. (2005): A randomized trial of low-dose aspirin in the primary prevention of cardiovascular disease in women. In: *N. Engl. J. Med.* 352 (13), S. 1293–1304.
- Rizzo, M. T. (2011): Cyclooxygenase-2 in oncogenesis. In: *Clin. Chim. Acta* 412 (9-10), S. 671–687.
- Robert Koch Institut (Hrsg.): Krebs in Deutschland für 2013/2014. 11. Ausgabe. Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg). Berlin, 2017.
- Robert Koch Institut (Hrsg.): Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016. Zentrum für Krebsregisterdaten im Robert Koch-Institut (Hrsg). Berlin, 2016.
- Roock, W. de; Claes, B.; Bernasconi, D.; Schutter, J. de; Biesmans, B.; Fountzilias, G.; Kalogeras, K. T.; Kotoula, V.; Papamichael, D.; Laurent-Puig, P.; Penault-Llorca, F.; Rougier, P.; Vincenzi, B.; Santini, D.; Tonini, G.; Cappuzzo, F.; Frattini, M.; Molinari, F.; Saletti, P.; Dosso, S. de; Martini, M.; Bardelli, A.; Siena, S.; Sartore-Bianchi, A.; Tabernero, J.; Macarulla, T.; Di Fiore, F.; Gangloff, A. O.; Ciardiello, F.; Pfeiffer, P.; Qvortrup, C.; Hansen, T. P.; van Cutsem, E.; Piessevaux, H.; Lambrechts, D.; Delorenzi, M.; Tejpar, S. (2010): Effects of KRAS, BRAF, NRAS, and PIK3CA mutations on the efficacy of cetuximab plus chemotherapy in chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer. A retrospective consortium analysis. In: *The Lancet Oncology* 11 (8), S. 753–762.
- Rothwell, P. M.; Wilson, M.; Elwin, C.-E.; Norrving, B.; Algra, A.; Warlow, C. P.; Meade, T. W. (2010): Long-term effect of aspirin on colorectal cancer incidence and mortality. 20-year follow-up of five randomised trials. In: *The Lancet* 376 (9754), S. 1741–1750.
- Rothwell, P. M.; Wilson, M.; Price, J. F.; Belch, J. F. F.; Meade, T. W.; Mehta, Z. (2012): Effect of daily aspirin on risk of cancer metastasis: a study of incident cancers during randomised controlled trials. In: *Lancet (London, England)* 379 (9826), S. 1591–1601.
- Samowitz, W. S.; Holden, J. A.; Curtin, K.; Edwards, S. L.; Walker, A. R.; Lin, H. A.; Robertson, M. A.; Nichols, M. F.; Gruenthal, K. M.; Lynch, B. J.; Leppert, M. F.; Slattery, M. L. (2001): Inverse relationship between microsatellite instability and K-ras and p53 gene alterations in colon cancer. In: *The American journal of pathology* 158 (4), S. 1517–1524.
- Samuels, Y.; Diaz, L. A.; Schmidt-Kittler, O.; Cummins, J. M.; Delong, L.; Cheong, I.; Rago, C.; Huso, D. L.; Lengauer, C.; Kinzler, K. W.; Vogelstein, B.; Velculescu, V. E. (2005): Mutant PIK3CA promotes cell growth and invasion of human cancer cells. In: *Cancer Cell* 7 (6), S. 561–573.

- Samuels, Y.; Velculescu, V. E. (2014): Oncogenic Mutations of PIK3CA in Human Cancers. In: *Cell Cycle* 3 (10), S. 1221–1224.
- Samuels, Y.; Wang, Z.; Bardelli, A.; Silliman, N.; Ptak, J.; Szabo, S.; Yan, H.; Gazdar, A.; Powell, S. M.; Riggins, G. J.; Willson, J. K. V.; Markowitz, S.; Kinzler, K. W.; Vogelstein, B.; Velculescu, V. E. (2004): High frequency of mutations of the PIK3CA gene in human cancers. In: *Science* 304 (5670), S. 554.
- Sano, H.; Kawahito, Y.; Wilder, R. L.; Hashiramoto, A.; Mukai, S.; Asai, K.; Kimura, S.; Kato, H.; Kondo, M.; Hla, T. (1995): Expression of cyclooxygenase-1 and -2 in human colorectal cancer. In: *Cancer research* 55 (17), S. 3785–3789.
- Sargent, D. J.; Goldberg, R. M.; Jacobson, S. D.; Macdonald, J. S.; Labianca, R.; Haller, D. G.; Shepherd, L. E.; Seitz, J. F.; Francini, G. (2001): A pooled analysis of adjuvant chemotherapy for resected colon cancer in elderly patients. In: *The New England journal of medicine* 345 (15), S. 1091–1097.
- Saridaki, Z.; Tzardi, M.; Papadaki, C.; Sfakianaki, M.; Pega, F.; Kalikaki, A.; Tsakalaki, E.; Trypaki, M.; Messaritakis, I.; Stathopoulos, E.; Mavroudis, D.; Georgoulas, V.; Souglakos, J. (2011): Impact of KRAS, BRAF, PIK3CA mutations, PTEN, AREG, EREG expression and skin rash in  $\geq 2$  line cetuximab-based therapy of colorectal cancer patients. In: *PLoS ONE* 6 (1), e15980. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015980>.
- Sartore-Bianchi, A.; Martini, M.; Molinari, F.; Veronese, S.; Nichelatti, M.; Artale, S.; Di Nicolantonio, F.; Saletti, P.; Dosso, S. de; Mazzucchelli, L.; Frattini, M.; Siena, S.; Bardelli, A. (2009): PIK3CA mutations in colorectal cancer are associated with clinical resistance to EGFR-targeted monoclonal antibodies. In: *Cancer research* 69 (5), S. 1851–1857.
- Sartore-Bianchi, A.; Moroni, M.; Veronese, S.; Carnaghi, C.; Bajetta, E.; Luppi, G.; Sobrero, A.; Barone, C.; Cascinu, S.; Colucci, G.; Cortesi, E.; Nichelatti, M.; Gambacorta, M.; Siena, S. (2007): Epidermal growth factor receptor gene copy number and clinical outcome of metastatic colorectal cancer treated with panitumumab. In: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 25 (22), S. 3238–3245.
- Schubbert, S.; Shannon, K.; Bollag, G. (2007): Hyperactive Ras in developmental disorders and cancer. In: *Nature reviews. Cancer* 7 (4), S. 295–308.
- Sheng, H.; Shao, J.; Washington, M. K.; DuBois, R. N. (2001): Prostaglandin E2 increases growth and motility of colorectal carcinoma cells. In: *The Journal of Biological Chemistry* 276 (21), S. 18075–18081.
- Sheng H; Shao J; Morrow JD; Beauchamp RD; DuBois RN. (1998): Modulation of Apoptosis and Bcl-2 Expression by Prostaglandin E2 in Human Colon Cancer Cells. In: *Cancer Res.* 58 (2). S. 362-366.

- Shields, J. M.; Pruitt, K.; McFall, A.; Shaub, A.; Der, C. J. (2000): Understanding Ras: 'it ain't over 'til it's over'. In: *Trends in cell biology* 10 (4), S. 147–154.
- Shimokawa and Smith (1992): Prostaglandin endoperoxide synthase. The aspirin acetylation region. In: *The Journal of Biological Chemistry* (267), S. 12387–12392.
- Smith, W.L. (1989): The eicosanoids and their biochemical mechanisms of action. In: *Biochem J.* (259(2)), S. 315–324.
- Smith, W. L.; Garavito, R. M.; DeWitt, D. L. (1996): Prostaglandin Endoperoxide H Synthases (Cyclooxygenases)-1 and -2. In: *J. Biol. Chem.* 271 (52), S. 33157–33160.
- Sood, A.; McClain, D.; Maitra, R.; Basu-Mallick, A.; Seetharam, R.; Kaubisch, A.; Rajdev, L.; Mariadason, J. M.; Tanaka, K.; Goel, S. (2012): PTEN gene expression and mutations in the PIK3CA gene as predictors of clinical benefit to anti-epidermal growth factor receptor antibody therapy in patients with KRAS wild-type metastatic colorectal cancer. In: *Clinical colorectal cancer* 11 (2), S. 143–150.
- Stephens, L.; Anderson, K.; Stokoe, D.; Erdjument-Bromage, H.; Painter, G. F.; Holmes, A. B.; Gaffney, P. R.; Reese, C. B.; McCormick, F.; Tempst, P.; Coadwell, J.; Hawkins, P. T. (1998): Protein kinase B kinases that mediate phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate-dependent activation of protein kinase B. In: *Science (New York, N.Y.)* 279 (5351), S. 710–714.
- Stewart, B. W.; Wild, C. P. (2014): World cancer report 2014. Lyon, France, Geneva, Switzerland: International Agency for Research on Cancer; Distributed by WHO Press, World Health Organization.
- Stratton, M. R.; Fisher, C.; Gusterson, B. A.; Cooper, C. S. (1989): Detection of point mutations in N-ras and K-ras genes of human embryonal rhabdomyosarcomas using oligonucleotide probes and the polymerase chain reaction. In: *Cancer research* 49 (22), S. 6324–6327.
- Strickler, J. H.; Hurwitz, H. I. (2012): Bevacizumab-based therapies in the first-line treatment of metastatic colorectal cancer. In: *The oncologist* 17 (4), S. 513–524.
- Sung, J.; Ho, J.; Chan, F.; Tsoi, K. (2018): Low-Dose Aspirin Can Reduce Colorectal Cancer Mortality After Surgery: a 10-year Follow Up of 13,528 Colorectal Cancer Patients. In: *Journal of gastroenterology and hepatology* 34 (6), S. 1027–1034.
- Takkouche, B.; Regueira-Méndez, C.; Etminan, M. (2008): Breast cancer and use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs: a meta-analysis. In: *J. Natl. Cancer Inst.* 100 (20), S. 1439–1447.
- Taylor, D. P.; Burt, R. W.; Williams, M. S.; Haug, P. J.; Cannon-Albright, L. A. (2010): Population-based family history-specific risks for colorectal cancer: a constellation approach. In: *Gastroenterology* 138 (3), S. 877–885.

- Tazawa, R.; Xu, X. M.; Wu, K. K.; Wang, L. H. (1994): Characterization of the genomic structure, chromosomal location and promoter of human prostaglandin H synthase-2 gene. In: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 203 (1), S. 190–199.
- Tomozawa, S.; Nagawa, H.; Tsuno, N.; Hatano, K.; Osada, T.; Kitayama, J.; Sunami, E.; Nita, M. E.; Ishihara, S.; Yano, H.; Tsuruo, T.; Shibata, Y.; Muto, T. (1999): Inhibition of haematogenous metastasis of colon cancer in mice by a selective COX-2 inhibitor, JTE-522. In: *British journal of cancer* 81 (8), S. 1274–1279.
- Tsujii M; Kawano S; DuBois RN. (1997): Cyclooxygenase-2 expression in human colon cancer cells increases metastatic potential. In: *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94 (7), S. 3336–3340.
- Tsujii M; Kawano S; Tsuji S; Sawaoka H; Hori M; DuBois RN. (1998): Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells. In: *Cell* 93 (5), S. 705–713.
- Tsujii M, DuBois RN. (1995): Alterations in cellular adhesion and apoptosis in epithelial cells overexpressing prostaglandin endoperoxide synthase 2. In: *Cell* 83 (3), S. 493–501.
- Uddin, S.; Ahmed, M.; Hussain, A.; Assad, L.; Al-Dayel, F.; Bavi, P.; Al-Kuraya, K. S.; Munkarah, A. (2010): Cyclooxygenase-2 inhibition inhibits PI3K/AKT kinase activity in epithelial ovarian cancer. In: *Int. J. Cancer* 126 (2), S. 382–394.
- van Cutsem, E.; Köhne, C.-H.; Hitre, E.; Zaluski, J.; Chang Chien, C.-R.; Makhson, A.; D'Haens, G.; Pintér, T.; Lim, R.; Bodoky, G.; Roh, J. K.; Folprecht, G.; Ruff, P.; Stroh, C.; Tejpar, S.; Schlichting, M.; Nippgen, J.; Rougier, P. (2009): Cetuximab and chemotherapy as initial treatment for metastatic colorectal cancer. In: *N. Engl. J. Med.* 360 (14), S. 1408–1417.
- Vanhaesebroeck, B.; Leever, S. J.; Panayotou, G.; Waterfield, M. D. (1997): Phosphoinositide 3-kinases: a conserved family of signal transducers. In: *Trends in Biochemical Sciences* 22 (7), S. 267–272.
- Vanhaesebroeck, B.; Guillermet-Guibert, J.; Graupera, M.; Bilanges, B. (2010): The emerging mechanisms of isoform-specific PI3K signalling. In: *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11 (5), S. 329–341.
- Vivanco, I.; Sawyers, C. L. (2002): The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. In: *Nat. Rev. Cancer* 2 (7), S. 489–501.
- Wang, D.; DuBois, R. N. (2008): Pro-inflammatory prostaglandins and progression of colorectal cancer. In: *Cancer letters* 267 (2), S. 197–203.
- Wennogle LP; Liang H; Quintavalla JC; Bowen BR; Wasvary J; Miller DB; Allentoff A; Boyer W; Kelly M; Marshall P. (1995): Comparison of recombinant cyclooxygenase-2 to native isoforms: aspirin labeling of the active site. In: *FEBS Lett.* 371 (3), S. 315–320.

- Williams, C. S.; Mann, M.; DuBois, R. N. (1999): The role of cyclooxygenases in inflammation, cancer, and development. In: *Oncogene* 18 (55), S. 7908–7916.
- Wittekind, C. (2017): TNM - Klassifikation maligner Tumoren (8. Auflage), Wiley VCH Verlag GmbH, Weinheim, S.1-22, 94-100.
- Wu, W. K. K.; Sung, J. J. Y.; Lee, C. W.; Yu, J.; Cho, C. H. (2010): Cyclooxygenase-2 in tumorigenesis of gastrointestinal cancers: an update on the molecular mechanisms. In: *Cancer Lett.* 295 (1), S. 7–16.
- Yamauchi, M.; Morikawa, T.; Kuchiba, A.; Imamura, Y.; Qian, Z. R.; Nishihara, R.; Liao, X.; Waldron, L.; Hoshida, Y.; Huttenhower, C.; Chan, A. T.; Giovannucci, E.; Fuchs, C.; Ogino, S. (2012): Assessment of colorectal cancer molecular features along bowel subsites challenges the conception of distinct dichotomy of proximal versus distal colorectum. In: *Gut* 61 (6), S. 847–854.
- Yao, M.; Lam, E. C.; Kelly, C. R.; Zhou, W.; Wolfe, M. M. (2004): Cyclooxygenase-2 selective inhibition with NS-398 suppresses proliferation and invasiveness and delays liver metastasis in colorectal cancer. In: *British journal of cancer* 90 (3), S. 712–719.
- Yarden, Y. (2001): The EGFR family and its ligands in human cancer. In: *European Journal of Cancer* 37, S. 3–8.
- Ye, X.-F.; Wang, J.; Shi, W.-T.; He, J. (2014): Relationship between aspirin use after diagnosis of colorectal cancer and patient survival: a meta-analysis of observational studies. In: *British journal of cancer* 111 (11), S. 2172–2179.
- Yoshida, K.; Fujino, H.; Otake, S.; Seira, N.; Regan, J. W.; Murayama, T. (2013): Induction of cyclooxygenase-2 expression by prostaglandin E2 stimulation of the prostanoid EP4 receptor via coupling to Galphai and transactivation of the epidermal growth factor receptor in HCA-7 human colon cancer cells. In: *European journal of pharmacology* 718 (1-3), S. 408–417.

## Anhang

Nr.	Alter bei ED	Geschlecht	Tumor Lokalisation	Grading/ TNM-Stadium	PIK3CA	KRAS	ASS-Einnahme	Überleben >10 Jahre nach ED	Überleben in Tagen (max. 3650 Tage) nach ED
1	72	W	Colon descendens	G2 T3 N0 M0	WT	WT	Ja	Ja	3650
2	62	W	Colon sigmoideum	G2 T3 N0 M0	WT	WT	Nein	Ja	3650
3	65	W	Colon descendens	G2 T3 N1 M0	WT	G12V	Nein	Ja	3650
4	60	W	Colon descendens	G2 T3 N0 M0	WT	WT	Nein	Ja	3650
5	66	M	Colon ascendens	G2 T3 N0 M0	WT	G12S	Nein	Nein	553
6	39	W	Colon descendens	G2 T3 N1 M0	WT	G12D	Nein	Ja	3650
7	69	M	Colon descendens	G2 T3 N0 M0	WT	G13D	Nein	Ja	3650
8	73	M	Colon ascendens	G2 T2 N0 M0	WT	WT	Ja	Ja	3650
9	71	W	Colon transversum	G3 T3 N2 M0	Mut.	WT	Nein	Ja	2032
10	58	M	Colon sigmoideum	G2 T2 N1 M0	WT	G12A	Nein	Nein	1901
11	75	W	Colon sigmoideum	G2 T3 N0 M0	WT	G12D	Ja	Nein	514
12	64	M	Colon sigmoideum	G2 T2 N0 M0	Mut.	G12V	Ja	Nein	859
13	74	W	Colon sigmoideum	G2 T3 N0 M0	Mut.	WT	Nein	Nein	2219
14	82	M	Colon sigmoideum	G2 T3 N1 M0	WT	WT	Nein	Nein	1490
15	73	M	Colon ascendens	G2 T3 N0 M0	Mut.	G13D	Nein	Ja	3650

16	78	W	Colon ascendens	G2 T1 N1 M0	WT	G12V	Ja	Ja	3650
17	83	M	Colon ascendens	G3 T3 N1 M0	WT	G12D	Ja	Nein	1780
18	54	W	Colon descendens	G2 T4 N1 M0	Mut.	G13D	Nein	Nein	1495
19	55	W	Colon sigmoideum	G2 T3 N2 M1 (hepatic)	WT	G12S	Nein	Ja	3650
20	71	M	Colon sigmoideum	G2 T3 N2 M0	WT	G12C	Nein	Nein	866
21	74	M	Colon sigmoideum	G2 T3 N1 M1 (hepatic)	WT	G12V	Ja	Nein	293
22	49	M	Colon descendens	G2 T4 N1 M0	Mut.	G12D	Nein	Ja	3650
23	73	M	Colon sigmoideum	G2 T3 N2 M0	WT	WT	Nein	Nein	1923
24	77	M	Colon sigmoideum	G2 T3 N0 M0	WT	WT	Nein	Ja	3650
25	81	M	Colon descendens	G1 T3 N0 M0	Mut.	G12D	Ja	Ja	3650
26	74	W	Colon descendens	G2 T1 N0 M0	WT	G13D	Nein	Ja	3650
27	69	M	Colon ascendens	G2 T3 N2 M1 (hepatic)	WT	WT	Nein	Nein	692
28	62	M	Colon descendens	G2 T2 N0 M0	WT	G12V	Nein	Ja	3650
29	91	M	Colon ascendens	G3 T3 N0 M0	WT	WT	Nein	Nein	27
30	72	W	Colon sigmoideum	G2 T3 N1 M0	WT	WT	Nein	Ja	3650
31	74	M	Colon ascendens	G2 T3 N0 M0	Mut.	G12S	Nein	Nein	1577
32	88	W	Colon sigmoideum	G2 T3 N0 M0	WT	G13D	Nein	Nein	3018
33	66	M	Colon ascendens	G2 T2 N0 M0	Mut.	WT	Nein	Ja	3650
34	64	M	Colon sigmoideum	G2 T3 N0 M0	WT	G13D	Nein	Nein	7

35	67	M	Colon ascendens	G2 T3 N0 M0	WT	WT	Nein	Nein	646
36	62	M	Colon sigmoideum	G2 T3 N1 M0	WT	WT	Ja	Ja	3650
37	74	M	Colon transversum	G2 T3 N0 M0	WT	WT	Ja	Nein	61
38	69	W	Colon descendens	G2 T3 N1 M0	WT	G12V	Nein	Nein	1318
39	70	M	Colon sigmoideum	G2 T1 N0 M0	WT	G12V	Nein	Ja	3650
40	69	W	Colon ascendens	G2 T3 N2 M0	WT	WT	Ja	Nein	2135
41	78	M	Colon sigmoideum	G2 T2 N0 M0	Mut.	WT	Ja	Nein	802
42	79	M	Colon ascendens	G2 T3 N0 M0	WT	WT	Ja	Ja	3650
43	63	M	Colon descendens	G2 T3 N1 M0	WT	G12C	Ja	Nein	685
44	69	M	Colon ascendens	G3 T2 N1 M0	Mut.	G12S	Ja	Nein	1144
45	73	M	Colon sigmoideum	G2 T3 N1 M0	Mut.	WT	Ja	Nein	915
46	68	M	Colon sigmoideum	G2 T3 N0 M0	WT	G12V	Ja	Ja	3650
47	66	W	Colon sigmoideum	G3 T4 N0 M0	WT	G13D	Nein	Nein	1877
48	68	M	Colon descendens	G3 T3 N2 M0	WT	WT	Nein	Nein	494
49	91	W	Colon sigmoideum	G3 T4 N0 M0	WT	WT	Nein	Nein	1706
50	61	M	Colon sigmoideum	G2 T3 N0 M0	WT	G13D	Ja	Ja	3650
51	73	W	Colon ascendens	G3 T3 N2 M0	WT	WT	Nein	Nein	438
52	66	M	Colon sigmoideum	G2 T3 N2 M0	WT	G12V	Ja	Nein	2172
53	68	M	Colon sigmoideum	G2 T2 N0 M0	WT	WT	Ja	Ja	3650



54	73	W	Colon sigmoideum	G2 T2 N0 M0	WT	G13S	Nein	Nein	746
55	74	M	Colon descendens	G1 T3 N1 M0	Mut.	G12D	Ja	Nein	1552
56	56	M	Colon sigmoideum	G2 T3 N0 M0	WT	WT	Nein	Nein	775
57	83	W	Colon descendens	G2 T2 N0 M0	WT	G13D	Nein	Nein	1393
58	72	M	Colon sigmoideum	G2 T2 N0 M0	WT	G12D	Nein	Nein	2737
59	90	W	Colon sigmoideum	G2 T3 N0 M0	WT	G12S	Nein	Nein	64
60	71	W	Colon ascendens	G2 T3 N2 M0	Mut.	WT	Nein	Nein	2643
61	60	W	Colon sigmoideum	G2 T2 N0 M0	WT	WT	Nein	Ja	3650
62	87	M	Colon sigmoideum	G2 T3 N0 M0	WT	WT	Nein	Nein	1495
63	73	W	Colon descendens	G2 T3 N0 M0	WT	WT	Nein	Ja	3650
64	71	W	Colon ascendens	G2 T3 N1 M0	WT	G13D	Ja	Nein	2371
65	59	M	Colon ascendens	G2 T4 N0 M0	WT	G12D	Nein	Nein	1157
66	68	M	Colon ascendens	G2 T3 N2 M0	WT	WT	Nein	Nein	650
67	77	W	Colon ascendens	G2 T3 N0 M0	WT	G13D	Ja	Nein	1039
68	67	M	Colon descendens	G2 T3 N2 M0	Mut.	WT	Nein	Nein	3395
69	74	M	Colon descendens	G2 T3 N2 M0	WT	G13C	Nein	Nein	685
70	73	W	Colon ascendens	G2 T3 N2 M0	WT	WT	Ja	Nein	2711
71	78	W	Colon sigmoideum	G2 T2 N0 M0	WT	G12C	Ja	Ja	3650
72	77	M	Colon transversum	G2 T3 N0 M0	WT	WT	Nein	Nein	3259

73	78	M	Colon sigmoideum	G2 T3 N1 M0	WT	WT	Nein	Nein	1732
74	70	M	Colon ascendens	G2 T3 N1 M0	Mut.	WT	Nein	Ja	3650
75	68	M	Colon ascendens	G2 T1 N0 M0	WT	G13S	Ja	Ja	3650
76	73	W	Colon ascendens	G2 T3 N1 M0	WT	WT	Nein	Ja	3650
77	76	M	Colon ascendens	G2 T1 N0 M0	WT	G13D	Nein	Nein	2314
78	66	M	Colon sigmoideum	G2 T2 N0 M0	WT	G12D	Ja	Ja	3650
79	68	W	Colon sigmoideum	G2 T3 N2 M0	WT	WT	Nein	Ja	3650
80	70	M	Colon ascendens	G2 T3 N2 M0	WT	G12V	Nein	Nein	1551
81	81	W	Colon sigmoideum	G2 T2 N0 M0	WT	G12D	Nein	Nein	386
82	69	W	Colon descendens	G2 T3 N1 M1 (hepatic)	WT	G12V	Ja	Ja	3650
83	63	M	Colon descendens	G3 T3 N0 M0	Mut.	G13D	Nein	Nein	372
84	53	W	Colon descendens	G2 T3 N1 M0	WT	G12D	Nein	Ja	3650
85	52	W	Colon ascendens	G2 T3 N0 M0	WT	WT	Nein	Ja	3650
86	64	M	Colon sigmoideum	G2 T3 N1 M0	Mut.	WT	Nein	Nein	2687
87	74	W	Colon sigmoideum	G3 T3 N0 M0	WT	WT	Nein	Ja	3650
88	74	W	Colon ascendens	G2 T3 N0 M0	WT	WT	Nein	Ja	3650
89	86	W	Colon ascendens	G2 T2 N0 M0	WT	WT	Ja	Nein	1977
90	68	M	Colon ascendens	G2 T3 N1 M1 (hepatic)	WT	WT	Nein	Nein	570
91	73	M	Colon descendens	G2 T2 N0 M0	WT	WT	Nein	Ja	3650

92	63	M	Colon ascendens	G2 T2 N0 M0	WT	G12D	Nein	Nein	943
93	38	W	Colon sigmoideum	G2 T3 N0 M0	WT	WT	Nein	Nein	1119
94	78	M	Colon sigmoideum	G2 T3 N0 M0	WT	WT	Nein	Nein	514
95	63	W	Colon ascendens	G2 T3 N0 M0	WT	G13D	Nein	Ja	3650
96	64	M	Colon sigmoideum	G2 T3 N1 M0	WT	G12D	Ja	Nein	2913
97	51	W	Colon sigmoideum	G3 T4 N0 M0	WT	G13D	Nein	Nein	1440
98	79	M	Colon descendens	G2 T2 N0 M0	Mut.	WT	Nein	Nein	1772
99	64	M	Colon descendens	G2 T2 N0 M0	WT	G12V	Ja	Ja	3650
100	68	M	Colon transversum	G2 T3 N0 M0	Mut.	G12V	Nein	Nein	1976
101	75	M	Colon transversum	G2 T3 N0 M0	WT	G12D	Nein	Ja	1598
102	72	W	Colon ascendens	G3 T3 N1 M0	WT	G12D	Ja	Ja	3650
103	62	W	Colon sigmoideum	G2 T2 N0 M0	WT	G13D	Nein	Ja	3650
104	65	M	Colon transversum	G1 T3 N0 M0	WT	WT	Nein	Ja	3650
105	92	M	Colon ascendens	G2 T3 N0 M0	WT	G12D	Nein	Nein	13
106	52	M	Colon sigmoideum	G1 T3 N1 M0	WT	G12D	Ja	Ja	3650
107	51	M	Colon sigmoideum	G2 T3 N2 M0	WT	G13D	Nein	Nein	159
108	68	M	Rectum	G2 T2 N0 M0	WT	G13D	Nein	Ja	3650
109	77	W	Rectum	G2 T2 N1 M0	WT	G13D	Ja	Ja	3650
110	53	M	Rectum	G2 T1 N0 M0	WT	G13D	Nein	Ja	3650

111	65	W	Rectum	G2 T2 N0 M0	WT	G13D	Ja	Ja	3650
112	60	M	Rectum	G2 T3 N2 M0	WT	G13D	Nein	Ja	3650
113	81	M	Rectum	G2 T3 N0 M0	WT	G12D	Ja	Nein	1828
114	74	M	Rectum	G2 T3 N2 M0	WT	G13D	Nein	Ja	3650
115	77	M	Rectum	G2 T2 N1 M0	WT	G12D	Ja	Ja	3650
116	50	M	Rectum	G3 T3 N2 M0	WT	G12V	Nein	Nein	1300
117	63	M	Rectum	G2 T3 N0 M0	WT	G21D	Ja	Ja	3650
118	55	M	Rectum	G2 T3 N2 M0	WT	G13D	Nein	Nein	2624
119	75	M	Rectum	G2 T2 N0 M0	WT	G13D	Nein	Ja	3650
120	82	W	Rectum	G2 T2 N0 M0	WT	WT	Nein	Nein	2294
121	77	W	Rectum	G2 T3 N0 M0	WT	G12V	Ja	Nein	3155
122	69	W	Rectum	G2 T3 N1 M0	WT	G12S	Nein	Ja	3650
123	77	M	Rectum	G3 T3 N2 M0	WT	WT	Nein	Nein	395
124	76	M	Rectum	G2 T1 N0 M0	WT	G12D	Ja	Ja	3650
125	72	W	Rectum	G2 T3 N0 M0	WT	WT	Nein	Nein	1875
126	82	M	Rectum	G2 T2 N0 M0	WT	G12D	Nein	Nein	3268
127	82	W	Rectum	G2 T2 N0 M0	Mut.	G13D	Nein	Nein	2446
128	77	W	Rectum	G2 T2 N0 M0	WT	G12S	Ja	Ja	3650
129	65	W	Rectum	G2 T2 N1 M0	WT	WT	Ja	Ja	3650

130	70	M	Rectum	G2 T3 N0 M0	WT	WT	Nein	Ja	3650
131	73	M	Rectum	G2 T3 N0 M0	WT	G12D	Ja	Ja	3650
132	83	W	Rectum	G2 T3 N0 M0	WT	WT	Ja	Nein	276
133	73	M	Rectum	G2 T3 N0 M0	WT	G12D	Ja	Ja	3650
134	63	W	Rectum	G2 T2 N0 M0	WT	WT	Nein	Ja	3650
135	36	W	Rectum	G2 T3 N1 M0	WT	G13D	Nein	Nein	1055
136	71	M	Rectum	G2 T3 N1 M0	Mut.	G12V	Nein	Nein	1202
137	84	W	Rectum	G2 T2 N0 M0	WT	WT	Nein	Nein	2397
138	61	W	Rectum	G2 T2 N0 M0	WT	WT	Nein	Ja	3650
139	81	M	Rectum	G2 T3 N0 M0	WT	G12D	Ja	Ja	3650
140	66	M	Rectum	G2 T3 N0 M0	WT	WT	Ja	Nein	920
141	68	M	Rectum	G1 T3 N0 M0	WT	G12D	Nein	Ja	3650
142	69	M	Rectum	G2 T2 N0 M0	Mut.	G12A	Ja	Nein	1804
143	53	M	Rectum	G2 T3 N1 M0	WT	WT	Ja	Nein	433
144	90	M	Rectum	G2 T3 N2 M0	WT	WT	Nein	Nein	566
145	69	W	Rectum	G2 T2 N0 M0	WT	G12D	Nein	Ja	3650
146	61	W	Rectum	G2 T3 N1 M0	WT	WT	Nein	Ja	3650
147	71	W	Rectum	G2 T2 N0 M0	WT	G12C	Nein	Ja	3650
148	82	W	Rectum	G3 T3 N0 M0	WT	WT	Nein	Nein	845

149	85	W	Rectum	G2 T2 N0 M0	Mut.	WT	Nein	Nein	3
150	56	M	Rectum	G2 T3 N0 M0	WT	WT	Nein	Ja	3650
151	68	M	Rectum	G2 T3 N1 M0	WT	WT	Nein	Nein	2192
152	81	M	Rectum	G2 T3 N1 M0	WT	WT	Ja	Nein	533
153	79	W	Rectum	G2 T3 N1 M0	WT	G12V	Ja	Nein	519

## **Verzeichnis der akademischen Lehrer/-innen**

Meine akademischen Lehrer an der Philipps-Universität Marburg waren in alphabetischer Reihenfolge die folgenden Damen und Herren:

Adamkiewicz, Alter, Aumüller, Bahr, Barth, Bartsch, Basler, Bauer, Baum, Baumann, Becker, Berger, Bette, Bien, Bliemel, Cetin, Czubayko, Daut, Del Rey, Dodel, Eilers, Elfarra, Fendrich, Feuser, FuchsWinkelmann, Geks, Görg, Gress, Grimm, Grundmann, Grzeschik, Hadji, Hartmann, Hasilik, Hegele, Hertl, , Heyse, Hofmann, Hoffmann, Horn, Hoyer, Höffken, Hundt, Kalder, Kalinowski, Kann, Kanngießer, Kim-Berger, Kircher, Kirschbaum, Klingmüller, Klose, Koczulla, Köhler, König, Konrad, Koolman, Krause, Krüger, Kuhlmann, Kühne, Kühnert, Lang, Lemke, Leonhardt, Lill, Löffler, Lohoff, Maier, Maisch, Moll, Moosdorf, Mueller, Müller, Mutters, Neubauer, Neumüller, Nimsky, Oertel, Olbert, Pagenstecher, Plant, PreisigMüller, Ramaswamy, Reese, Renz, Richter, Riera- Knorrenschild, Röhm, Ruchholtz, Schäfer, Schmidt, Schierl, Schofer, Seitz, Sekundo, Sevinc, Sommer, Steiniger, Steinkamp, Strauch, Suske, Tackenberg, Timmesfeld, Teymoortash, Vogelmeier, Vogt, Wagner, Waldegger, Waldmann, Weihe, Werner, Westermann, Wilhelm, Wrocklage, Wulf, Zemlin, Ziring.

## **Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich mich bei all jenen bedanken, die mich im Rahmen dieser Dissertation auf unterschiedlichste Weise unterstützt haben.

Ich möchte mich zunächst ganz herzlich bei Prof. Dr. med. Andreas Neubauer für die Überlassung des Themas sowie die exzellente Betreuung im Rahmen dieser Arbeit bedanken. Mein ganz besonderer Dank gilt auch PD Dr. Cornelia Brendel für die hilfreiche Begleitung in der Bearbeitung des Themas, für die zuverlässige Beantwortung aller Fragen und für die kritische Durchsicht dieser Arbeit.

Ein herzlicher Dank geht zudem an die Mitarbeiterinnen der Abteilung für Hämatologie, Onkologie und Immunologie des Universitätsklinikum Marburg. Vor allem aber gilt dieser Dank Kathleen Stabla für die geduldige Anleitung bei der Bearbeitung des Themas im Labor. Darüber hinaus möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Roland Moll für die Kooperation mit dem Pathologisches Institut des Universitätsklinikum Marburg bedanken. Hier gilt auch mein außerordentlicher Dank den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Pathologischen Instituts des Universitätsklinikum Marburg für Ihre mühevollen Einarbeitung der Probenbearbeitung und der ausgesprochen netten Hilfsbereitschaft. Weiterhin danke ich Prof. Dr. med. Thorsten Stiewe sowie Frau Dr. Andrea Nist für die Durchführung der KRAS Multiplex-Sequenzierung. Ein herzlicher Dank geht zudem an Prof. Dr. med. Anette Fiebeler für die Unterstützung bei den statistischen Analysen.

Zudem möchte ich mich bei Julia, Anna-Lena und Hildegard für die liebevolle Unterstützung bedanken.

Abschließend gilt mein ganz herzlicher Dank meinen Eltern Manfred und Gabi, meiner Schwester Katharina und meinem Freund Patrick.